Aus der Medizinischen Universitätspoliklinik in Marburg/Lahn
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. H. Kaffarnik

INSULIN- UND C-PEPTIDSERUMSPIEGEL BEIM MENSCHEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

ROSWITHA SCHMIDT
aus Kassel

Marburg 1978

Druck: Mauersberger, Marburg

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546807_0008

Aus der Medizinischen Universitätspoliklinik in Marburg/Lahn
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. H. Kaffarnik

INSULIN- UND C-PEPTIDSERUMSPIEGEL BEIM MENSCHEN

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

ROSWITHA SCHMIDT

aus Kassel

Marburg 1978

Druck: Mauersberger, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Universität Marburg am: 1. 3. 1978
gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Humanmedizin

Dekan: Prof. Dr. F. Neurath
Referent: Priv. Doz. Dr. med. L. Hausmann
Correferent: Prof. Dr. med. H. Kaffarnik

Meinen Freunden im Anatomischen Institut
der Philipps-Universität Marburg
gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	
1.1	Zur Biochemie des Insulins	S. 1
1.2	Klinische Relevanz der Insulin- und C-Peptidbestimmung	S. 5
1.3	Problemstellung	S. 7
2	Methodik	
2.1	Das Radioimmunoassay	S. 9
2.1.1	Prinzip des Radioimmunoassays	S. 10
2.1.2	Insulin (^{125}J) Radioimmunoassay Kit	S. 12
2.1.3	Testdurchführung	S. 12
2.1.4	Auflösen und Verdünnen	S. 12
2.1.5	Verfahrensablauf	S. 13
2.1.6	C-Peptid (^{125}J) Radioimmunoassay Kit	S. 17
2.1.7	Lösungen	S. 17
2.1.8	Verfahrensablauf	S. 19
2.2	Die Säulenchromatographie	S. 19
2.2.1	Prinzip der Säulenchromatographie	S. 20
2.2.2	Zubereitung der Gele	S. 21
2.2.3	Füllen der Säulen	S. 22
2.2.4	Aufgeben der Proben	S. 23
2.3	Die Serum-Extraktion	S. 23
2.4	Gefriertrocknung und Auflösen der Fraktionen	S. 24
2.5	Glukose-Toleranz-Tests	S. 25
2.5.1	Intravenöser Tolbutamid-Test	S. 25
2.5.2	Intravenöser Glukose-Toleranz-Test	S. 27
2.5.3	Oraler Glukose-Toleranz-Test	S. 29

2.6	Bestimmung des Blutzuckers	S. 31
2.7	Patientengut	S. 31
3	Ergebnisse	
3.1	Säulenchromatographie: Erstellen und Modifizierung der Methode	S. 33
3.1.1	Serum-Extraktion und Wiederfindung	S. 33
3.1.2	Säulenchromatographie (Sephadex G 50 fine) von Patientenserum und radioaktiv markiertem Insulin und C-Peptid	S. 35
3.1.3	Säulenchromatographie (Sephadex G 15) von Patientenserum	S. 38
3.1.4	Insulin- und C-Peptidbestimmung in der Verdünnungsreihe	S. 42
3.1.5	Säulenfüllmaterial und Wiederfindung	S. 44
3.1.6	Säulenfüllmaterial und Trennqualität	S. 45
3.1.7	Insulin- und C-Peptidbestimmung nach Reduzierung der Serummenge	S. 57
3.1.8	Lösen der Fraktionen zur Insulin- und C-Peptidbestimmung	S. 69
3.2	Insulin- und C-Peptidwerte im intravenösen Tolbutamid-Test	S. 71
3.3	Insulin- und C-Peptidwerte im intravenösen Glukose-Toleranz-Test	S. 88
3.4	Insulin- und C-Peptidwerte im oralen Glukose-Toleranz-Test	S. 101
4	Diskussion	
4.1	Metabolismus und Degradation von Insulin, Proinsulin und C-Peptid	S. 122

4.2 Qualitative Betrachtung der Insulin- und C-Peptidkurven in den einzelnen Glukose-Toleranz-Tests S. 123
4.3 Der molare C-Peptid/Insulin-Quotient S. 125
4.4 Quantitative Aussagen über die Insulin- und C-Peptidkonzentrationen in den einzelnen Glukose-Toleranz-Tests S. 125

5 Zusammenfassung S. 131

6 Literatur S. 134

1 Einleitung

1.1 Zur Biochemie des Insulins

Die Anschauungen über den Diabetes mellitus waren in den früheren Jahren einseitig in Richtung einer Störung des Kohlenhydratstoffwechsels fixiert. Fortschritte der Biochemie der letzten zwei Jahrzehnte, vor allem auch in der Erforschung von Regulationsmechanismen, haben ein etwas anderes Licht auf dieses Krankheitsbild geworfen. Die Störungen des Zellstoffwechsels bei der "Zuckerkrankheit" erwiesen sich als viel komplexer, nachdem man herausfand, daß neben dem Kohlenhydratstoffwechsel auch Fett- und Eiweißstoffwechsel negativ verändert sind. Eine wesentliche Rolle spielen dabei eine Anzahl von Hormonen, die die Funktionsfähigkeit und das Zusammenspiel einzelner Organe kontrollieren. Den wohl wesentlichsten und umfassensten Anteil daran hat neben Glukagon und den Katecholaminen das Insulin (PETRIDES et al 1972, KARLSON et al. 1978).
Die akute Insulinwirkung beim höheren Säuger, insbesondere beim Menschen wird vor allem durch folgende Effekte bestimmt (SÖLING 1975):

1. Hemmung der Glykogenolyse und Stimulation der Glykogensynthese (hauptsächlich in der Leber).
2. Hemmung der Lipolyse (hauptsächlich in den Fettgeweben).
3. Stimulation des Glukosetransportes in die Zellen (hauptsächlich im Muskel- und Fettgewebe).
4. Stimulation des Transportes von Aminosäuren (hauptsächlich im Muskel- und Fettgewebe).
5. Stimulation der Kaliumaufnahme (insbesondere im Muskel- und Fettgewebe sowie in der Leber).

Das Insulin ist ein Peptidhormon. Es besteht aus insgesamt 51 Aminosäuren, die in zwei Ketten (A- und B-Kette) - ver-

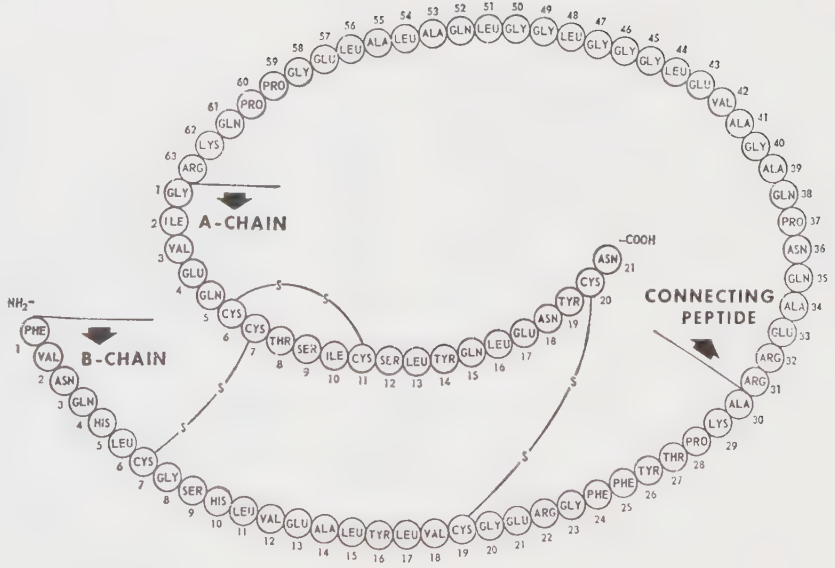

Abb. 1: Primärstruktur von Schweineproinsulin

bunden durch zwei Disulfidbrücken - angeordnet sind. Intensive Untersuchungen der Insulin-Biosynthese brachten die Erkenntnis, daß das Insulin nicht nach A- und B-Kette getrennt (HUMBEL 1965), sondern in Form einer einzigen Peptidkette als Proinsulin synthetisiert wird.
STEINER und OYER entdeckten das Proinsulin 1967 in einem menschlichen Inselzelladenom. Das Molekül beginnt am N-Terminus mit der B-Kettensequenz des Insulins und endet mit der Insulin A-Kette, verbunden werden die beiden Ketten durch ein sogenanntes Connecting ("C")-Peptid-Segment, das aus 31 Aminosäuren besteht.
Aus Proinsulin, das sich immunologisch sehr ähnlich wie Insulin verhält, jedoch nur sehr geringe biologische Aktivität besitzt, entsteht in der ß-Zelle des Pankreas durch proteolytische Spaltung Insulin (KEMMLER 1975).

An Hand eines prinzipiellen Konzepts für Synthese, Transport und Sekretion sekretorischer Proteine, das auf den inzwischen klassischen Studien von PALADE und JAMIESON (1967a, 1967b, 1968a, 1968b, 1971) an zymogenen Proteinen des Pankreas beruht, wird folgender Sekretionszyklus in der ß-Zelle vorgeschlagen: Proinsulin wird in den Ribosomen des rauhen endoplasmatischen Reticulums (R.E.R.) synthetisiert, in die Zisternen des R.E.R's abgegeben und von dort über die weichen Mikrosomen zur Peripherie des Golgi-Apparates transportiert. Der Weg zum Golgi-Apparat dauert etwa 10 min. Die kondensierenden Vacuolen des Golgi-Komplexes bilden sich um zu Sekretgranula, wo sich die Proteine nach 40 bis 60 min. anreichern (KEMMLER 1973 u. 1975).
Man kann davon ausgehen, daß das Proinsulin nach der ribosomalen Synthese bereits im tubulären System der Golgi-Zone in den ß-Granula gespeichert wird und sich dort über verschiedene Zwischenstufen, unter Abspaltung der Dipeptide Lys/Arg und Arg/Arg, in die in äquimolaren Mengen vorhandenen Sekretionsprodukte Insulin und C-Peptid umwandelt. Aus der granulären Speicherform gelangt Insulin zusammen mit

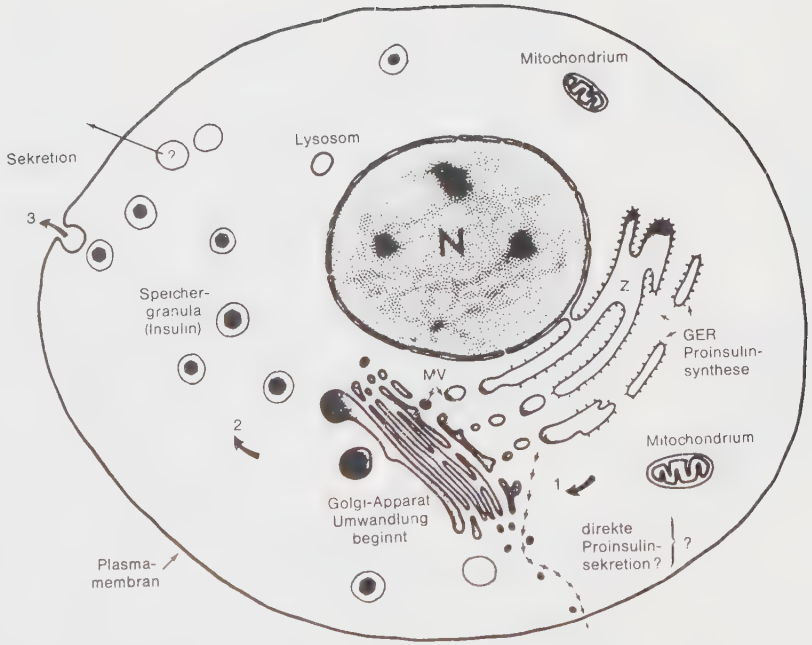

Abb. 2: ß-Zelle im Pankreas

dem C-Peptid und kleinen Mengen Proinsulin direkt durch Emiozytose der ß-Granula in den extrazellulären Raum (KEMMLER 1972).

Der Transport der Granula zur Zellwand und die Fusion der Granulum-Membran mit der Wand wird durch ein als Leitschiene vorstellbares System zytoplasmatischer Mikrotubuli und ein der Zellwand unmittelbar anliegendes Netzwerk von Mikrofilamenten vermittelt (FRERICHS 1975).

Wanderung und Auflösung der Granula sowie die unmittelbare Ausschüttung von neu produziertem Insulin sind an die Wirkung von Sekretionsreizen gebunden. Der wirksamste Reiz ist der Anstieg der Glukosekonzentration im Blut. Die Glukose wirkt wahrscheinlich nicht direkt, sondern auf dem Umweg über ein Zwischenprodukt des Glukosestoffwechsels der ß-Zelle, der durch das vermehrte Angebot an Glukose gesteigert ist. Für diesen Mechanismus nimmt man einen membranständigen "Glukoserezeptor" an, der den Anstieg der Glukosekonzentration registriert.

1.2 Klinische Relevanz der Insulin- und C-Peptidbestimmung

Aufgrund der oben erwähnten Verknüpfung, gibt es bei kaum einer endokrinologischen Störung einen so leicht meßbaren und durch Belastungsteste beeinflußbaren peripheren Parameter der Hormonwirkung wie die Blutglukosekonzentration beim Diabetes mellitus. Darum wird die Glukosebestimmung auch auf breiter Basis angewendet. Die Serum-Insulinbestimmung dagegen ist meist speziellen diabetologischen Zentren vorbehalten. Man kann mit ihrer Hilfe bei Diabetikern verschiedene Insulin-Sekretionstypen unterscheiden und damit sowohl eine bessere Diagnose als auch eine klarere Prognose stellen. Diese Methode ist jedoch insofern limitiert als man sie nur bei Diabetikern anwenden kann, die zuvor nicht mit Insulin behandelt wurden. Bei einer vorangegangenen Insulinbehandlung kann man mit dem Auftreten von Insulinantikörpern

im Serum der Patienten rechnen (BLOCK et al. 1972 u. 1973, HORWITZ et al. 1975, LEWIS et al. 1976). Wird der Seruminsulinspiegel radioimmunologisch bestimmt, so treten die Insulinantikörper in Wechselwirkung mit dem zugefügten Radioinsulin und stören somit die Reaktion zwischen dem markierten Insulin, dem endogenen Insulin und den Meerschweinchen Insulinantikörpern und führen zu falschen Ergebnissen. Man hat versucht mit verschiedenen Extraktionsmethoden und anschließender Messung des gesamten und des freien Insulins exakte Insulinwerte zu erhalten. Jedoch erwiesen sich diese Methoden als sehr aufwendig und ungenau (HEDING 1972, NAKAGAWA 1973, KUZUYA 1977).

1970 wurde von MELANI ein Radioimmunoassay für das menschliche C-Peptid entwickelt (RUBENSTEIN et al. 1969, MELANI et al. 1970). Da man für das Insulin und C-Peptid eine Sekretion aus den ß-Zellen in äquimolaren Mengen postuliert hatte, war damit eine Möglichkeit geschaffen, die ß-Zell-Funktion bei insulinabhängigen Diabetikern zu kontrollieren (BLOCK et al. 1971).

Verschiedene Forschungsgruppen beschäftigen sich seither mit der C-Peptidbestimmung und deren Anwendungsmöglichkeit (BEISCHER et al. 1976).

Sehr eindrucksvoll wird von HORWITZ et al. (1975) der Fall eines Patienten mit insulinabhängigem Diabetes mellitus geschildert, der nüchtern spontan Hypoglykämie entwickelte. An Hand einer sehr hohen basalen C-Peptid-Reaktivität, die bei 19,5 ng/ml lag, wurde die Diagnose eines endogenen Hyperinsulinismus gestellt. Nach einer subtotalen Pankreatektomie sank der CPR-Spiegel und die nüchtern Hypoglykämie verschwand.

Bei einer "totalen" Pankreatektomie aufgrund eines Karzinoms, bietet die C-Peptid-Bestimmung die Möglichkeit zur Untersuchung, ob pankreatisches Restgewebe verblieben ist, was mit einem bestimmbaren C-Peptidspiegel einhergehen würde.

Erfolgt nach der Entfernung eines Insuloms ein Anstieg des C-Peptidspiegels, so läßt das auf eine Wiederkehr des Tumors oder auf die Gegenwart funktionierender Metastasen schließen (HORWITZ et al. 1976).

Ein oft verblüffendes klinisches Problem bieten Patienten, die sich heimlich Insulin injizieren (BEISCHER 1975). Klärend kann in solch einem Fall nur die C-Peptidbestimmung wirken. Endogener Hyperinsulinismus wird sowohl durch die Erhöhung des Insulinwertes als auch durch Anstieg des C-Peptids angezeigt. Demgegenüber haben Patienten, deren Hypoglykämie von injiziertem Insulin herrührt, hohe Serum-insulinspiegel, die von niedrigen oder unmessbaren C-Peptid-konzentrationen begleitet werden.

1.3 Problemstellung

Die direkte Bestimmung der C-Peptidreaktivität im Serum von Patienten, wie sie zum Teil für die Lösung klinischer Probleme angewendet wird, hat zwar große Aussagekraft bezüglich der ß-Zell-Sekretion, jedoch haben diese Werte mehr qualitativen Charakter. Um eine echte Aussage über die Korrelation zwischen Insulin und C-Peptid im Serum zu machen, muß gewährleistet sein, daß die beiden Substanzen einmal quantitativ erfaßt werden und zum andern keine weiteren Verbindungen die Meßwerte verfälschen (HEDING 1975a, 1975b).
Als potentieller Störfaktor kommt dabei vor allem das Proinsulin in Betracht. Bei der radioimmunologischen Bestimmung des Insulins kann das Proinsulin im Test mit dem Insulinantikörper reagieren (Kreuzreaktion), was zu einer scheinbaren Erhöhung des Insulinwertes führt.

Wie schon oben erwähnt wurde, werden durch die Zuführung von externem Insulin Antikörper entwickelt, die das Insulin-immunoassay stören. Auf die C-Peptidbestimmung haben diese Antikörper keinen direkten Einfluß, weil sie nicht mit menschlichem C-Peptid reagieren. Allerdings sind sie in der Lage sich an menschliches Proinsulin zu binden.

Bei einem gesunden Probanden macht das Proinsulin nur 1 - 4% der C-Peptidreaktivität aus; bei insulinabhängigen, diabetischen Patienten kann dieser Anteil jedoch bei über 80% liegen und damit eine quantitative Aussage über die Insulinsekretion mittels des C-Peptidwertes unmöglich machen.

Es soll darum Aufgabe dieser Arbeit sein, mit Hilfe der Säulenchromatographie das Proinsulin vom Insulin und C-Peptid im Serum abzutrennen, um danach die beiden Komponenten eindeutig bestimmen zu können und eine Korrelation zwischen ihnen sowohl im basalen Zustand als auch unter Belastung zu finden. Für die Untersuchungen wurden Seren von Patienten mit unterschiedlicher Glukosestoffwechsellage herangezogen.

2 Methodik

2.1 Das Radioimmunoassay

Biologisch aktive Substanzen sind oft bereits in Nanogramm- oder noch kleineren Mengen wirksam. Kenntnisse über ihre Wirkungsweise setzen daher hochempfindlich mikroanalytische Nachweismethoden voraus. Chemische, chromatographische oder spektrometrische Verfahren erwiesen sich häufig als zu unempfindlich; erst durch die Entdeckung des Radioimmunoassays (RIA) gelang die quantitative Bestimmung kleinster Substanzmengen in Gegenwart eines millionenfachen Überschusses an Fremdstoffen. Das Radioimmunoassay verbindet die hohe Nachweisempfindlichkeit radioaktiv markierter Substanzen mit der großen Spezifität immunologischer Reaktionen. Wegen ihrer Empfindlichkeit, Spezifität, einfachen Handhabung und insbesondere aufgrund der generellen Anwendbarkeit sind radioimmunologische Methoden anderen Analysenverfahren überlegen (H. DITSCHUNEIT 1975, PANITZ 1976, ECKERT 1976).

Der Ursprung des Radioimmunoassays geht auf das Jahr 1956 zurück, in dem Berson und Yalow mit ^{131}J-markiertem Insulin Versuche an Diabetikern durchführten. Sie stellten fest, daß das freie Insulin im Plasma durch Insulinantikörper, die sich als insulinbindende γ-Globuline erwiesen, gebunden wurde. Durch das markierte Insulin konnten die Autoren nachweisen, daß nach der erfolgten Bindung an den Antikörper ein Austausch von noch freiem Antigen gegen schon gebundenes möglich war. Damit wurde das Prinzip des kompetitiven Bindungsverhaltens, wie man es von der Enzymkinetik schon kannte, auch im Bereich der Antigen-Antikörper-Wechselwirkung bestätigt (BERSON u. YALOW 1959).

2.1.1 Prinzip des Radioimmunoassays

Die in vivo und in vitro ablaufende Reaktion beruht auf der Paßform von Antigen (Ag) und Antikörper (Ak), die beide korrespondieren "wie Schlüssel und Schloß" (Emil Fischer). Bei hinreichend großer Bindungsaffinität des Antikörpers stellt sich im Laufe der Reaktion zwischen den Reaktionspartnern und dem gebildeten wasserlöslichen Antigen-Antikörper-Komplex (Ag · Ak) ein charakteristisches Gleichgewicht ein:

$$Ag + Ak \rightleftharpoons Ag \cdot Ak$$

Wird das unmarkierte Antigen (Ag) durch radioaktiv markiertes Antigen (Ag*) ersetzt, das sich chemisch nicht oder nur geringfügig, immunologisch jedoch keinesfalls von diesem unterscheidet, so gilt analog

$$Ag^* + Ak \rightleftharpoons Ag^* \cdot Ak$$

Radioimmunologische Meßsysteme auf der Basis dieser beiden Reaktionsgleichungen erlauben die Bestimmung kleinster Substanzmengen des Antigens (Ag), wenn drei Voraussetzungen erfüllt sind:

1. Der Antikörper (Ak) kann zwischen radioaktiv markierter Substanz (Ag*) und der zu bestimmenden unmarkierten Verbindung (Ag) nicht unterscheiden, d.h. die Bindungskonstante K ist für die Komplexe Ag · Ak und Ag* · Ak gleich.
2. Es müssen mehr radioaktiv markierte Antigenmoleküle (Ag*) als Bindungsplätze des Antikörpers vorhanden sein, d.h. die Menge Antikörper (Ak) ist so zu begrenzen, daß neben den gebildeten Komplexen Ag* · Ak immer (auch bei Abwesenheit der unmarkierten Substanz) noch freies markiertes Antigen (Ag) vorliegt.

3. Innerhalb eines Meßsystems werden die Konzentration der radioaktiven Verbindung und die eingesetzte Menge des Antikörpers in allen Testansätzen konstant gehalten. Die Konzentration des unmarkierten, zu bestimmenden Antigens ist demnach die einzige Variable in diesem System. Unter den genannten Voraussetzungen läßt sich das Radioimmunoassay sehr einfach als kompetitive Proteinbindungsanalyse verstehen. Eine variable Menge einer Substanz (Ag) und eine konstante Menge derselben, radioaktiv markierten Verbindung (Ag*) konkurrieren um eine begrenzte und ebenfalls konstante Zahl von Bindungsplätzen des Antikörpers (Ak).

$$Ag + Ag^* + Ak \rightleftharpoons \begin{matrix} Ag \cdot Ak + Ag^* \\ Ag^* \cdot Ak + Ag \\ (B) \qquad (F) \end{matrix}$$

Entsprechend dieser Beziehung werden vom Antikörper um so weniger radioaktiv markierte Moleküle (Ag*) komplex gebunden (B), je mehr unmarkierte (Ag) vorhanden sind. Damit ist der Anteil der Bindung zwischen radioaktiven Molekülen und Antikörper ein Maß für die Konzentration der zu bestimmenden Verbindung. Um quantitativ festzustellen, welcher Anteil der markierten Verbindung nach Einstellung des Gleichgewichtes komplex gebunden ist (B), sind aus dem Inkubationsgemisch alle Antigen-Antikörper-Komplexe (Ag* · Ak, Ag · Ak) vom freien, nicht gebundenen Antigen (Ag*, Ag) abzutrennen. Nach der Trennung und der Messung der Radioaktivität der gebundenen (B) oder freien Phase (F) kann aus einer Eichkurve, die mit der standardisierten Substanz erstellt wird, der Gehalt einer Probe direkt abgelesen werden.

2.1.2 Insulin (^{125}J) Radioimmunoassay Kit

Der Insulin-RIA-Kit erlaubt die Bestimmung von Humaninsulin im Serum oder Plasma im Bereich von 0 - 160 µE/ml.
Das Verfahren basiert auf der kompetitiven Bindung von Insulin und jodiertem (^{125}J) Insulin an einen Anti-Insulin-Antikörper.

Dieser für Insulin spezifische Antikörper ist gebrauchsfertig an einen präzipitierenden zweiten Antikörper gekoppelt und dient als Insulin-Bindungsreagenz. Der unlösliche Komplex Insulin/Insulin-Bindungsreagenz kann vom verbleibenden ungebundenen Insulin mittels Filtration abgetrennt werden.

Der Anteil des antikörpergebundenen radioaktiven Insulins ist der Konzentration des nicht markierten Insulins in der untersuchten Probe umgekehrt proportional.

2.1.3 Testdurchführung

Der Kit enthält Reagenzien für den Ansatz von 160 Teströhrchen. Damit können bei Doppelbestimmungen 68 Proben bestimmt werden. Darüberhinaus reichen sie aus, um die Standardkurve festzulegen und in weiteren Teströhrchen die Gesamtaktivität und die unspezifische Bindung "blanks" zu ermitteln.

2.1.4 Auflösen und Verdünnen

a) Puffer

In beide Behälter mit Pufferkonzentrat werden 30 ml Aqua bidest gegeben. Nach dem Auflösen wird die Pufferlösung in einen Meßzylinder umgefüllt, die Behälter mehrfach mit destilliertem Wasser gespült, die Spülflüssigkeit ebenfalls in den Meßzylinder gefüllt und nach dem Auffüllen der Pufferlösung auf ein Gesamtvolumen von 200 ml vorsichtig geschüttelt.

b) Insulin-Bindungsreagenz

Der Inhalt beider Fläschchen wird mit je 8 ml Aqua bidest gelöst und vorsichtig geschüttelt.

c) Jodiertes (^{125}J) Insulin

In ein sauberes Glasfläschchen werden 14 ml Pufferlösung pipettiert, 2 ml jodiertes (^{125}J) Insulin zugefügt und vorsichtig gemischt.

d) Insulin-Standard-Vorratslösung

Die Anzahl der im Fläschchen enthaltenen Mikroeinheiten ist auf dem Etikett vermerkt. Mit Pufferlösung ist so aufzufüllen, daß sich eine Lösung mit 1000 µE/ml ergibt. Enthält das Fläschchen z.B. 2 300 µE, so sind 2,3 ml Pufferlösung zuzugeben. Die Lösung mit 1000 µE/ml dient als Standard-Vorratslösung.

e) Insulin-Standardlösungen

Zu 400 µl der Standard Vorratslösung werden 2,1 ml Pufferlösung pipettiert und sorgfältig gemischt. Die resultierende Lösung hat eine Konzentration von 160 µE/ml. Aus dieser Lösung werden die erforderlichen Insulinstandards nach folgendem Schema hergestellt.

Insulin Konzentration µE/ml	0	10	20	40	80	160
Insulinlösung mit 160 µE/ml (µl)	-	100	100	200	500	1000
Pufferlösung (µl)	1000	1500	700	600	500	--

Vor dem Gebrauch werden die Standardverdünnungen auf dem Schüttelmixer sorgfältig durchgemischt.

2.1.5 Verfahrensablauf

1. Die Teströhrchen werden nach dem in Tabelle 1 dargestellten Schema beschriftet.

Die Standardverdünnungen werden dreifach, die unbekannten Proben doppelt bestimmt.

2. Es werden jeweils 100 µl Pufferlösung, Insulinstandardverdünnung oder unbekannte Probe in die entsprechenden Teströhrchen pipettiert.

3. Dazu werden jeweils 100 µl Insulin-Bindungsreagenz gegeben, außer in die Röhrchen 1 - 3 (Gesamtaktivität) und 22 - 24 (unspezifische Bindung, "blanks"). Auf dem Schüttelmixer gut durchmischen. Bei 2 - 4° C wird 45 min. inkubiert.

4. In alle Teströhrchen werden je 100 µl jodiertes (^{125}J) Insulin pipettiert und auf dem Schüttelmixer gemischt. Röhrchen 1 - 3 (Gesamtaktivität) wird für die Aktivitätsmessung beiseitegestellt, die übrigen Testansätze werden bei 2 - 4° C mindestens 2 Std. 15 min. inkubiert.

5. Die Gewinnung der Präcipitate aus den Teströhrchen erfolgt über Mikrofiltration des Inhalts durch Millipore-Zellulose-Acetat Filter. Die vorher in Puffer eingeweichten Filter werden auf einen Millipore-Filterträger gelegt, der über eine Vakuumflasche mit der Wasserstrahlpumpe verbunden ist. Mit einer Eppendorfpipette wird der Inhalt der Teströhrchen auf den Filter gegeben und abgesaugt. Die Röhrchen werden mit 700 µl Puffer nachgewaschen und diese Waschlösung ebenfalls über den Filter abgesaugt.
   Danach wird das Filterpapier mit einer spitzgebogenen Pinzette vom Filter abgehoben, zweimal gefaltet und zur Radioaktivitätsmessung in ein Zählröhrchen gegeben.

6. Die Zählröhrchen mit den Filtern werden in einen Szintillationszähler gestellt und ihre Radioaktivität als Zählrate pro Minute (PM) gemessen.

7. Die Auswertung erfolgt mit Hilfe einer "Calculator Program Card" (Hewlett Packard Nr. 09819-75263). Es werden die Insulinwerte der unbekannten Proben in µE/ml vom Computer ausgedruckt.

Tab. 1: Verfahrensübersicht

		Standards (µE/ml)							
	Gesamt-aktivität	0	10	20	40	80	160	"blanks"*	unbek. Probe
Teströhrchen-Nr.	1 - 3	4-6	7-9	10-12	13-15	16-18	19-21	22-24	25,26
Pufferlösung	-	100	-	-	-	-	-	200	-
Insulin-Standardverdünnung 0 - 160 µE/ml	-	-	100	100	100	100	100	-	-
Unbek. Serum/Plasma	-	-	-	-	-	-	-	-	100
Insulin-Bindungsreagenz	-	100	100	100	100	100	100	-	100
auf dem Schüttelmixer durchmischen, 45 min bei 2 - 4° C inkubieren lassen									
Jodiertes (^{125}J) Insulin	100	100	100	100	100	100	100	100	100
auf dem Schüttelmixer durchmischen, mindestens 2 Std. 15 min bei 2 - 4° C inkubieren lassen									
Pufferlösung	-	700	700	700	700	700	700	700	700
auf dem Schüttelmixer durchmischen, zentrifugieren, dekantieren, messen									

alle Volumina in µl

*"blanks": unspezifische Bindung

2.1.6 C-Peptid Radioimmunoassay Kit

2.1.7 Lösungen

1. FAM-Puffer ist ein 0,04 M Phosphatpuffer, pH 7,4, der zur Verdünnung bzw. Auflösung des Antiserums und des ^{125}J-Tyr-C-Peptid verwendet wird. Er setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen:

$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	5,77 g
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	1,05 g
Humanalbumin (Behringwerke, trocken, reinst)	1,00 g
Natriummerthiolat	0,24 g

Es wird mit Aqua bidest auf 1000 ml aufgefüllt und der pH, der bei 7,4 liegen muß, überprüft.

2. NaFAM ist ein 0,04 M Phosphatpuffer, der, um isoton zu sein, NaCl enthält. Um die Proteinkonzentration des Serums nachzuahmen, werden 6% Albumin hinzugefügt. Der Puffer wird zur Herstellung der Standard-Lösungen sowie zur Verdünnung von Seren verwendet:

NaCl	0,6 g
Humanalbumin (Behringwerke, trocken, reinst)	5,9 g

Mit FAM wird auf 100 ml aufgefüllt.
Liegt der pH unter 7,3, so muß er mit 1 N NaOH eingestellt werden.

3. C-Peptid-Standardlösungen

Der Inhalt des Fläschchens, das 1 nmol synthetisches gefriergetrocknetes C-Peptid in 1 ml NaFAM enthält, wird mit 900 µl Aqua bidest aufgelöst, was einer C-Peptidlösung

von 1 nmol/ml NaFAM entspricht. Diese Vorratslösung ist bei -18° C über ein Jahr lang stabil.

Standard-Verdünnungsreihe:

10	pmol/ml:	100 µl	1 nmol/ml + 9,9 ml NaFAM
1	pmol/ml:	3 ml	10 pmol/ml + 27 ml NaFAM
0,7	pmol/ml:	7,0 ml	1 pmol/ml + 3,0 ml NaFAM
0,5	pmol/ml:	5,0 ml	" + 5,0 ml "
0,3	pmol/ml:	3,0 ml	" + 7,0 ml "
0,2	pmol/ml:	2,0 ml	" + 8,0 ml "
0,1	pmol/ml:	1,0 ml	" + 9,0 ml "
0,05	pmol/ml:	0,5 ml	" + 9,5 ml "

Als Nullwert wird NaFAM verwendet. Die Standards sind bei -20° C länger als 6 Monate haltbar.

4. ^{125}J-Tyr-C-Peptid-Lösung

Fläschchen B im Kit enthält gefriergetrocknetes ^{125}J-Tyr-C-Peptid. Sofort nach Eintreffen des Kits wird der Inhalt dieses Fläschchens in 900 µl Aqua bidest aufgelöst, was einer Lösung an ^{125}J-Tyr-C-Peptid von 100 pmol/ml entspricht. Kurz vor Anwendung der radioaktiv markierten Substanz im Immunoassay wird das ^{125}J-Tyr-C-Peptid 1 : 300 mit FAM verdünnt (d.h. 50 µl 100 pmol/ml + 14,95 ml FAM).

5. Anti-Human-C-Peptid-Lösung

Das Fläschchen A enthält 1 ml gefriergetrocknetes Serum M 1230 1 : 200 verdünnt in FAM. Der Inhalt wird ebenfalls in 900 µl Aqua bidest aufgelöst und bis zum weiteren Gebrauch tiefgefroren. Für das Radioimmunoassay werden 50 µl des aufgelösten Antiserums mit 7,45 ml FAM verdünnt, so daß eine Verdünnung von 1 : 30 000 entsteht.

2.1.8 Verfahrensablauf

a. 100 µl C-Peptid-Standard (0 - 1 pmol/ml), unbekannte Probe und 100 µl Antiserum (1 : 30 000) werden in die Countergläschen pipettiert, auf dem Schüttelmix gut durchmischt und 20 - 24 h bei 4° C inkubiert.

b. 100 µl ^{125}J-Tyr-C-Peptid (0,33 pmol/ml) werden unter Beibehaltung der Temperatur bei 4° C hinzugefügt, gemischt und für weitere 20 - 24 h im Kühlschrank (4° C) inkubiert.

c. Es werden 1,6 ml 96% Äthanol (welcher nicht aus absolutem Alkohol hergestellt sein sollte und Raumtemperatur hat) zu der Mischung gegeben, auf dem Vortex gemixt und 10 min bei 2000 G zentrifugiert.

d. Der Überstand wird verworfen, und das Präcipitat mit 2,0 ml folgender Lösung gewaschen:
960 ml 96% Äthanol, 18 ml FAM und 162 ml H_2O.
Es wird noch einmal bei 2000 G 10 min zentrifugiert, die Waschlösung verworfen, 0,5 ml einer 0,05 N NaOH-Lösung zum Präcipitat gegeben und gecountet.

e. Es wird eine Standardkurve erstellt, indem die Counts gegen die C-Peptid-Konzentration der entsprechenden Standards aufgetragen werden. Aus dieser Kurve können die C-Peptid-Konzentrationen der unbekannten Proben abgelesen werden.

2.2 Die Säulenchromatographie

Chromatographische Verfahren beruhen auf der unterschiedlichen Affinität der zu trennenden Stoffe eines Gemisches zu zwei verschiedenen Phasen, die nicht oder nur in begrenztem Umfang miteinander mischbar sind. Eine der Phasen befindet sich in Ruhe (stationäre Phase), da sie an einen

festen Träger gebunden ist, die andere in ständiger Bewegung (mobile Phase). Dadurch muß sich immer wieder ein neues Gleichgewicht zwischen beiden Phasen einstellen, was zu einer Trennung des Stoffgemisches führt. Nach Art der Kräfte, die bei der Einstellung der Gleichgewichte wirken, lassen sich Verteilungs-, Adsorptions-, Ionenaustausch- und Hohlraumdiffusionschromatographie unterscheiden, bei der jeweiligen Methode trifft zwar eine Kraft als das bestimmende Prinzip auf, sie wird aber meist von einer anderen, ebenfalls wirkenden Kraft beeinflußt. Bei der Hohlraumdiffusionschromatographie, die auch als Gel- oder Molekularsiebchromatographie bezeichnet wird, erfolgt die Trennung von Stoffgemischen aufgrund ihrer unterschiedlichen Molekülgröße (FISCHER 1969).

Vor der Einführung des Sephadex 1959, einem aus Glukose bestehenden Polysaccharid (Dextran), war dieses Trennverfahren sehr zeitraubend und teuer. Heute können Gelfiltrationen mit Hilfe von Gelen aus Dextran oder Polyacrylamid schnell und einfach ausgeführt werden.

2.2.1 Prinzip der Säulenchromatographie

Sephadex ist ein perlenförmiges Dextrangel. Aufgrund des hohen Anteils von Hydroxylgruppen in den Polysaccharidketten ist es stark hydrophil und quillt daher gut in Wasser und Elektrolytlösungen. Es gibt verschiedene Sephadex-Typen, die sich durch ihre Quelleigenschaften unterscheiden. Der Grad der Quellung ist ein wichtiges Charakteristikum des Gels. Gele, in welchen die Matrix die geringere Komponente darstellt, werden zur Fraktionierung von Substanzen mit hohem Molekulargewicht verwendet, während die dichteren Gele zur Trennung von niedermolekularen Verbindungen benutzt werden. Schickt man ein Substanzgemisch aus kleinen und großen Molekülen durch eine mit gequollenem Gel gefüllte Säule, so diffundieren die kleinen Moleküle in die Hohlräume der Gelpartikel hinein, während die großen Moleküle sich

nur im Lösungsmittel zwischen den Partikeln aufhalten, da sie infolge ihrer Molekülgröße nicht durch die Poren in die Gelpartikel eindringen können. Die größeren Moleküle passieren die Säule deshalb schneller und erscheinen früher im Eluat.

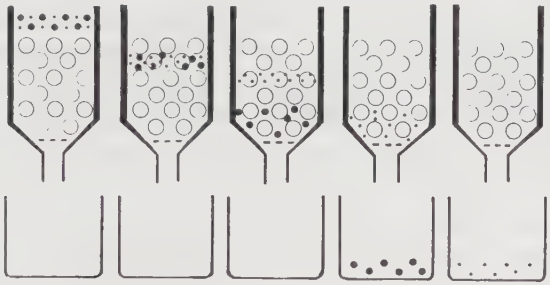

Abb. 3: Prinzip der Gelchromatographie

2.2.2 Zubereitung der Gele

Von der Firma Sephadex angegebene Quellzeiten

Sephadex-Typ	Minimale Quellzeit bei Raumtemperatur	im kochenden Wasserbad
G-15, G-25		
G-50	3h	1h

ca. 15 g Sephadex werden mit 250 ml 1 m Essigsäure in einem 500 ml Erlenmeyerkolben vermischt und für 1 1/2 h in ein kochendes Wasserbad gestellt. Es wird danach noch etwas Essigsäure zugegeben und über Nacht auf einem Rührmotor vorsichtig gerührt. Heftiges Rühren während des Quellvorgangs muß vermieden werden, da sonst die Gelkugeln gesprengt würden.

Durch das Kochen im Wasserbad werden Luftblasen aus dem

Gelbrei entfernt, die zu einem ungleichmäßigen Fluß nach dem Packen der Säule führen könnten.

2.2.3 Füllen der Säule

Das korrekte Packen des Gelbettes ist die wichtigste Voraussetzung für eine gute Leistung einer Gelfiltrationssäule. Unregelmäßigkeiten in der Packung geben Anlass zu einem ungleichmäßigen Säulenfluß, was oft zu einer Zonenverbreiterung und damit zu einer uneffektiven Trennung führt. Die Säule (d = 1,6 cm; V = 100,48 cm^3) wird vertikal fixiert und der Membranverschluß auf ihr unteres Ende aufgeschraubt. Um ein Verstopfen der Membran durch Gelpartikel zu verhindern, werden einige Fasern Nylonwatte auf die Membranoberfläche gelegt. Damit diese Watte beim Füllen der Säule nicht hochgedrückt wird, werden zuvor einige Milliliter 1 m Essigsäure durch die Säule gegeben.

Entlang einem Glasstab wird dann das aufgeschlämmte Gel bündig in die Säule gefüllt. Aufgrund des hydrostatischen Druckes formt sich langsam das Gelbett; es muß immer wieder, vor allem regelmäßig, Gel nachgefüllt werden, bis das Gelbett den oberen Rand der Säule erreicht hat.

Der nach unten aus der Säule führende Schlauch wird abgeklemmt, um ein Trockenlaufen des Gels zu verhindern.

Auf das obere Säulenende wird dann ebenfalls ein Membranverschluß aufgeschraubt. Dieser Verschluß ist durch einen dünnen Schlauch mit einem Vorratsgefäß verbunden, das das Eluierungsmittel, in unserem Fall die Essigsäure, enthält. Bevor der erste "Run" auf die Säule gegeben wird, wird sie für 2 Tage mit 1 m CH_3COOH äquilibriert. Der Arbeitsdruck (Abstand: Oberfläche des Eluierungsmittels im Vorratsgefäß und Schlauchende, das in die Fraktionsgefäße führt) beträgt etwa 150 cm H_2O.

2.2.4 Aufgeben der Probe

Die Probe wird in ein spitzes Reagenzglas gefüllt und am Vorratsgefäß befestigt. Der Säulenlauf wird unterbrochen und das obere Schlauchende aus dem Vorratsgefäß in die Probe überführt. Durch das Öffnen der Schlauchklemme wird dann die Probe auf die Säule aufgetragen. Der Schlauch wird erneut abgeklemmt, in das Eluierungsmittel getaucht und wieder geöffnet. Es wird solange eluiert, bis mindestens das Säulenvolumen von 100 ml einmal durchlaufen ist und damit die Wiederfindung der Probe in den Fraktionen gewährleistet ist. Die Säule kann danach zu weiteren Trennungen verwendet werden.

2.3 Serum - Extraktion

Bevor das Serum auf die Säule gegeben wird, um in seine Komponenten Proinsulin, Insulin und C-Peptid getrennt zu werden, wird es einem Extraktionsprozeß unterworfen (MELANI et al. 1970). Hierbei kommt es zu einer Dissoziation des antikörpergebundenen Proinsulins und Insulins, was vor allem bei mit Insulin behandelten Diabetikern in Rechnung zu stellen ist (FINK et al. 1974). Es werden weiterhin ein Teil der Serumproteine ausgefällt und damit als potentielle Störfaktoren beseitigt.

Ausgangsmaterial: 2 ml aufgetautes Serum

1. 2 ml Patientenserum werden mit 4 ml Aqua bidest und 15 ml Acid-Alkohol (375 ml 95% Alkohol + 7 ml konz. HCl) versetzt und 10 h bei 4° C stehen gelassen.
2. Nach Zentrifugation wird der pH des Überstandes mit NH_3 auf pH 8,5 eingestellt und das dabei entstehende Präzipitat erneut abzentrifugiert.
3. Der Überstand wird mit HCl auf pH 5,3 gebracht.

4. Pro ml des Extraktes werden 0,025 ml 2 n Ammoniumacetatlösung (pH 5,3) zugefügt. Pro 10 ml wird der Überstand mit 15 ml abs. Alkohol und 25 ml Diäthyläther versetzt.
   Diese Mischung wird für 12 - 16 Stunden in den Kühlschrank gestellt.
5. Der Niederschlag wird abzentrifugiert und der Überstand verworfen.
   Das Präzipitat wird in 2 ml 3 m Essigsäure gelöst und in dieser Form auf die Säule gegeben.

2.4 Gefriertrocknen und Auflösen der Fraktionen

Da als Eluierungsmittel bei der Säulenchromatographie Essigsäure verwendet wird, liegt der pH der einzelnen Fraktionen bei ca. 1,5. Die radioimmunologische Bestimmung kann jedoch nur bei einem pH zwischen 7 und 8 ausgeführt werden. Um diese Voraussetzung zu schaffen, werden die Fraktionen gefriergetrocknet und anschließend mit einem Milliliter eines Phosphatpuffers wieder gelöst.

Albumin - Phosphat - Puffer

3,1 g $NaH_2PO_4 \cdot 2\ H_2O$

2,5 g Humanalbumin (Behringwerke)

0,125 g Natriumäthylmercuriothiosalicylat (Thiomersalat)

Es wird Aqua bidest hinzugefügt, mit 2 n NaOH ein pH von 7,3 - 7,5 eingestellt und auf 500 ml aufgefüllt. Zu dieser Lösung werden noch 4,5 g NaCl gegeben.
Haltbarkeitsdauer des Puffers: ca. 7 Tage

2.5 Glukose - Toleranz - Tests

2.5.1 Intravenöser Tolbutamid-Test nach Unger und Madison

In den Tagen vor der Untersuchung aßen die Patienten normale kohlenhydratreiche Kost (KH-Anteil mindestens 250 g kH/die). Nach nächtlicher Nahrungskarenz wurden morgens zunächst 5 ml Blut zur Bestimmung der Nüchternwerte für Blutzucker, Insulin und C-Peptid entnommen. Dann erfolgte langsam innerhalb von 3 Minuten die Injektion von 20 ml einer 5%igen Tolbutamidlösung (Rastinon, Fa. Hoechst). In Abständen von 2', 5', 10', 20', 40' und 60' nach der Injektion wurde erneut Blut zur Bestimmung der drei Komponenten abgenommen. Nach der letzten Blutentnahme bekamen die Patienten eine kohlenhydratreiche Nahrung. Die Auswertung des Tolbutamid-Tests erfolgte durch die graphische Ermittlung des Trennwertes T_3 (Abb. 4) (LANGE et al. 1965).

Die Blutzuckerwerte werden in mg % auf halblogarithmisches Papier mit linearer Zeitachse eingetragen. Zwischen Nüchtern- und 60-Minuten-Wert wird eine Verbindungslinie gezogen. Danach erfolgt Eintragung und Ausmessung der Abstände zwischen Kurve und Verbindungslinie bei 10, 20, 30, 40 und 50 Minuten, wobei die 10- und 50-Minutenwerte nur graphisch interpoliert werden. Die Abstände unterhalb der Verbindungslinie erhalten ein negatives, oberhalb ein positives Vorzeichen. Die Summe der Abstände ist der Trennwert T_3.

Die Beurteilung des T_3-Wertes ist der Tab. 2 zu entnehmen.

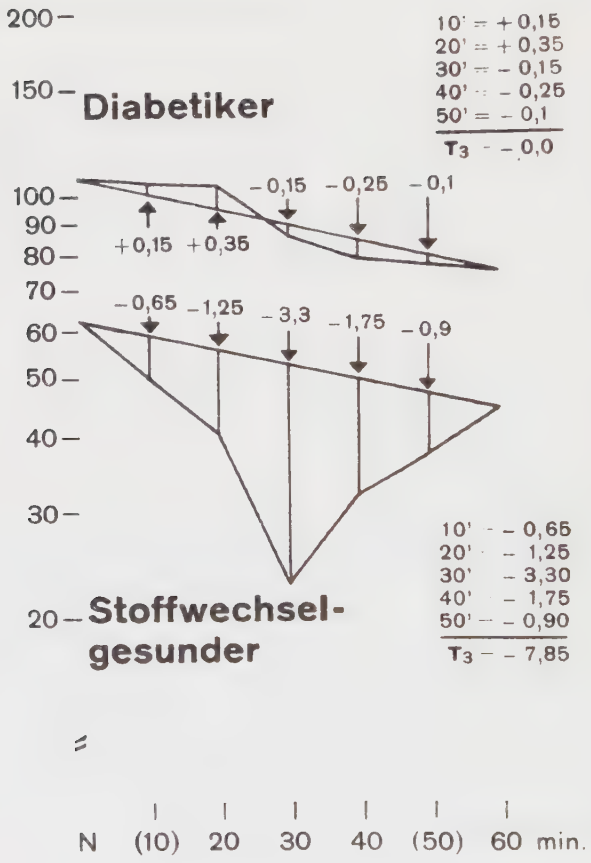

Abb. 4: Tolbutamid-Test in der T_3-Auswertung nach LANGE und KNICK

2.5.2 Intravenöser Glukose-Toleranz-Test nach Conard

Zu diesem Test mußten sich die Patienten an den Vortagen kohlenhydratreich ernähren (mindestens 250 g kH/die). Nach nächtlicher Nahrungskarenz erfolgte die Injektion von 50 ml einer 50%igen Glukoselösung innerhalb von 4 - 5 Minuten. Es wurden die Nüchternwerte für Blutzucker, Insulin und C-Peptid bestimmt sowie deren Werte 2', 5', 10', 15', 25', 35' und 55' nach der Injektion.

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte durch die Berechnung des Glukose-Assimilationskoeffizienten K, der ein Maß für die Geschwindigkeit der Glukoseelimination aus dem Blut darstellt (CONARD et al. 1955). Dazu werden die einzelnen Blutzuckerwerte als Funktion der Zeit auf semilogarithmisches Papier aufgetragen und durch eine Gerade miteinander verbunden.

Berechnung von K (Abb. 5).

Der Blutzuckerabfall folgt der Funktion

$$BZ_t = BZ_o \cdot e^{-k \cdot t}$$

$$\text{oder } BZ_{t_2} = BZ_{t_1} \cdot e^{-k \, (t_2 - t_1)}$$

$$K = \frac{\ln BZ_1 - \ln BZ_2}{t_2 - t_1}$$

Eine Vereinfachung der Formel ergibt sich, wenn man für $t_2 - t_1$ ein Zeitintervall wählt, in dem die Blutzuckerkonzentration um die Hälfte abfällt, d.h. der Halbwertszeit der Glukose entspricht.

In diesem Fall ist

$$t_2 - t_1 = 1/2 \; t_2$$

$$K = \frac{\ln BZ_1 - \ln(0{,}5 \cdot BZ_1)}{t_{1/2}}$$

INTRAVENÖSER GLUCOSE-TOLERANZ-TEST

mit Berechnung des Assimilationskoeffizienten K

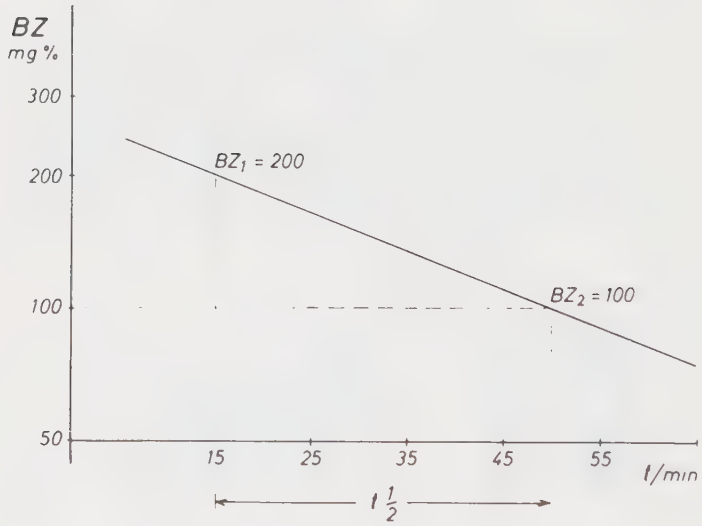

Abb. 5: Blutzuckerverlaufskurve beim intravenösen Glucose-Toleranz-Test. Die Halbwertszeit der Glucose t 1/2 beträgt in diesem Fall 35 min. Für den Assimilationskoeffizienten K ergibt sich somit:

$$K = \frac{69,3}{t\ 1/2} = \frac{69,3}{35} = 1,9$$

$$K = \frac{\ln BZ_1}{\frac{\ln BZ_1}{t_{1/2}} \cdot 0{,}5}$$

$$K = \frac{\ln 2}{t_{1/2}} = \frac{0{,}693}{t_{1/2}}$$

Dieser Wert wird mit 100 multipliziert:

$$K = \frac{0{,}693}{t_{1/2}} \cdot 100 = \frac{69{,}3}{t_{1/2}}$$

Die Beurteilung des K-Wertes ist der Tab. 2 zu entnehmen.

2.5.3 Oraler Glukose-Toleranz-Test

Die Vorbereitungen zu dem oralen Glukose-Toleranz-Test waren dieselben wie zu den vorher beschriebenen Tests. Am Morgen wurde zunächst Blut zur Bestimmung der Nüchternwerte entnommen. Danach bekamen die Patienten einen Gluko-Probetrunk (Fa. Boehringer, Mannheim), der 100 g Glukose enthielt, verabreicht. Nach 30, 60, 120 und 180 Minuten wurden erneut die Werte für Blutzucker, Insulin und C-Peptid bestimmt.

Die Beurteilung der Tests ist der Tab. 2 zu entnehmen.

Tab. 2: Glukose-Toleranz-Tests mit Normal- und Grenzwerten

Tests	normal	fraglich	pathologisch
IVGTT	K≧	K =	K≦
intravenöser Glukose-Toleranz-Test	1,21	0,91-1,20	0,90
TOLT	T_3≦	T_3=	T_3≧
intravenöser Tolbutamid-Test	-1,51	entfällt	-1,50
OGTT (mg/100ml)	BZ≦	BZ =	BZ≧
oraler Glukose-Toleranz-Test	1.Std. 160	161-180	180
	2.Std. 120	121-140	141
	3.Std. 100	101-110	111

(Lit.: HAUSMANN et al. 1975)

2.6 Bestimmung des Blutzuckers (BZ)

Beim Erhitzen mit o-Toluidin in saurer Lösung bildet Glukose einen grünen Farbstoff, der photometrisch gemessen wird und dessen Extinktion dem Glukosegehalt direkt proportional ist.

0,1 ml Vollblut wird mit 0,9 ml 3%iger Trichloressigsäure gemischt und damit enteiweißt. Nach dem Zentrifugieren wird der Überstand zur Blutzuckerbestimmung in den Auto-Analyzer gegeben.

2.7 Patientengut

Da in dieser Untersuchung die absoluten Insulin- und C-Peptidwerte eine untergeordnete Rolle spielen, vielmehr die beiden Größen in ihrer Korrelation betrachtet werden sollen, wurden aus einem breiten Spektrum von Patienten willkürlich 5 Probanden ausgewählt.

1970 wurde bei den fünf Patienten eine Leberzellverfettung unterschiedlicher Genese diagnostiziert, 1976 wurden die Patienten noch einmal untersucht.

Die Patienten 2 - 4 zeigten einen latenten Diabetes mellitus, während bei den Patienten 3 + 5 ein manifester Diabetes diagnostiziert werden konnte. Nur Patient 1 zeigte keine diabetische Stoffwechsellage.

Tab. 3: Masters-Tabelle

Patient	Alter	GOT (U/l)	GPT (U/l)	LDH (U/l)	Bil (mg/100ml)	Chol (mg/100ml)	K	T_3	Brocca	Alkohol	Histologie
1	36	14	18	135	0,9	195	1,30	-5,0	135	+	ausgeprägte Leberzellverfettung
2	46	6	5	170	0,3	220	1,08	-5,1	130	+	Leberfibrose
3	45	40	27	170	1,3	215	0,71	-3,9	147	+	deutl.Leberzellverfettung,chronische Alkohol-Hepatitis
4	29	16	24	195	0,9	175	1,24	-1,2	102	+	erhebliche Lberzellverfettung
5	41	8	11	110	0,4	300	1,51	+0,21	125	-	geringe Leberzellverfettung

3 Ergebnisse

Die wichtigste Voraussetzung, um die Frage nach der Korrelation zwischen Insulin und C-Peptid zu klären, war eine einwandfreie Abtrennung des Proinsulins von den beiden Komponenten Insulin und C-Peptid. Eine Trennung dieser Peptide war nicht notwendig, da das Insulin quantitativ neben dem C-Peptid bestimmt werden kann, ohne daß es zu einer Kreuzreaktion im Radioimmunoassay kommt.

3.1 Säulenchromatographie: Erstellen und Modifizierung der Methode

Bevor eine endgültige Entscheidung hinsichtlich des Säulenfüllmaterials getroffen werden konnte, wurden verschiedene Materialien auf ihre Trennqualität und Wiederfindungsrate getestet. Die mit Sephadex G 50 superfine gefüllten Säulen wurden mit radioaktiv markiertem Insulin, Proinsulin und C-Peptid geeicht; und es wurde eine sinnvolle Verdünnung der Fraktionen vor der Insulin- und C-Peptidbestimmung gefunden. Da nur geringe Mengen an Patientenserum zur Verfügung standen, mußte herausgefunden werden, ob die bis dahin für Extraktion und Säulenlauf in der Literatur angegebene Menge von 7 - 10 ml Serum auf 2 ml reduziert werden konnte.

3.1.1 Serum-Extraktion und Wiederfindung

Um herauszufinden, wie groß der Verlust an Insulin infolge der Serum-Extraktion ist, wurden drei Portionen à 4 ml eines Patientenserums dem Extraktionsprozeß unterworfen. Die Niederschläge der drei Extrakte wurden unterschiedlich behandelt:

1. Das Präzipitat wurde mit 3 m Essigsäure aufgenommen und mit Ammoniak auf pH 7 gebracht, um damit die Voraussetzung für den RIA-Kit zu erfüllen.

2. Das Präzipitat wurde in Phosphatpuffer (pH 7,4) des RIA-Kits gelöst.

3. Das Präzipitat wurde in 3 m Essigsäure gelöst, gefriergetrocknet und mit Phosphatpuffer (pH 7,4) wieder aufgenommen.

Alle drei Lösungen sowie das unbehandelte Serum wurden der Insulinbestimmung unterzogen.

	Insulingehalt (µE/ml)
unbehandeltes Serum	9,0
Lösung 1	8,5
Lösung 2	7,5
Lösung 3	8,0

Das beste Ergebnis wurde mit Methode 1 erzielt, jedoch setzte das eine exakte pH-Einstellung voraus, was sich bei einem Großversuch aus zeitlichen und technischen Gründen nicht realisieren läßt. Eine gute Wiederfindungsrate von 89% wurde auch nach Methode 3 erzielt.

Diese Methode, kombiniert mit einem Säulenlauf (Sephadex G 50 sf) wurde bei einem Kontrollserum der Biochemica Test Combination angewendet. 2 ml dieses Serums (Insulingehalt: 76 µE/ml) wurden extrahiert, das in 3 m Essigsäure aufgenommene Präzipitat auf die Säule gegeben und mit 1 m Essigsäure eluiert. Die Fraktionen 11 - 27 wurden gefriergetrocknet und in Phosphatpuffer gelöst. Jedem der 17 Gläser wurden 100 µl entnommen und in den Insulinbestimmungstest eingesetzt:

Fraktionen	µE/ml
15	0
16	0
17	10,82
18	10,87
19	14,00
20	20,47
21	38,70

Fraktionen	µE/ml
22	21,58
23	14,37
24	7,36
25	0
26	0
27	0
$\sum$	138,17 µE/ 2 ml

Insulingehalt des Serums vor der Extraktion:

152 µE/ 2 ml

Das entspricht einer Wiederfindungsrate von 90,9%.

Der Verlust an Insulin durch die Serum-Extraktion ist, wie damit gezeigt wurde, relativ gering.

3.1.2 Säulenchromatographie (Sephadex G 50 fine) von Patientenserum und radioaktiv markiertem Insulin und C-Peptid

5 ml Patientenserum wurden extrahiert, das Präzipitat in 5 ml 3 m Essigsäure aufgelöst und auf eine Säule (d= 1,6 cm; h = 50cm; v = 100 cm^3) die mit Sephadex G 50 fine gefüllt war, aufgetragen (Säulenrun: 100 Tropfen/Glas $\hat{=}$ 3,5 ml). Die Fraktionen 6 - 45 wurden gefriergetrocknet . In jedes Glas wurde 1 ml Phosphatpuffer gegeben und dessen Gehalt an Insulin und C-Peptid bestimmt. Diese Werte wurden gegen die Fraktionen aufgetragen, und es wurden zwei Kurven erhalten, deren Maxima bei Fraktion 20 lagen. Um sicherzustellen, daß es sich bei den beiden Peaks um Insulin bzw. C-Peptid handelt, wurde auf dieselbe Säule mit gleicher Tropfgeschwindigkeit sowohl radioaktiv markiertes Insulin als auch C-Peptid aufgetragen und in den entsprechenden Fraktionen die Radioaktivität gemessen. Die maximale Countzahl wurde für beide Substanzen ebenfalls in der Fraktion 20 gefunden.

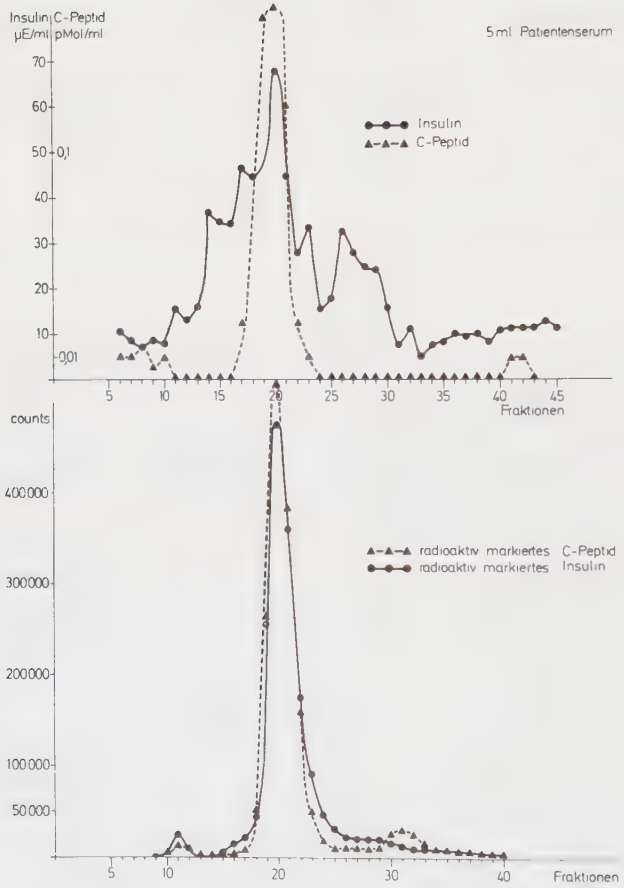

Abb. 6: Säulenchromatographie Sephadex G 50 fine von Patientenserum und radioaktiv markiertem Insulin und C-Peptid

Tab. 4: Die Eigenschaften der Gele Sephadex G 50 fine, G 15, G 50 superfine

Sephadex Typ	Teilchendurchmesser (trocken)	Fraktionierungsbereich (Molekulargewicht) Peptide u. globuläre Proteine	Bettvolumen ml/g Sephadex (trocken)
Sephadex G15	40 - 120	- 1500	2,5 - 3,5
Sephadex G50 fine	20 - 80		
superfine	10 - 40	1500 - 30 000	9 - 11

Wie aus der Zeichnung zu ersehen ist (Abb. 6), ist die Kurve des C-Peptids wesentlich definierter als die des Insulins. Eine Differenzierung zwischen einem eventuell vorliegenden Proinsulinpeak und dem Insulinpeak selbst kann nicht gemacht werden.

3.1.3 Säulenchromatographie (Sephadex G 15) von Patientenserum

Von dem Vorrat eines Aderlaß-Patienten wurden 8 ml Serum entnommen, enteiweißt und davon 6 ml auf eine Säule (V = 100 ml), die mit Sephadex G 15 gefüllt war, aufgetragen. Die Fraktionen wurden lyophilisiert und ihr Gehalt an Insulin und C-Peptid bestimmt.

Beide Kurven (Abb. 7) haben einen recht definierten Verlauf, so daß dieser Versuch auch quantitativ ausgewertet werden konnte. Interessanter Weise liegen die beiden Peaks im Fraktionierbereich der Säule, obwohl man an Hand von Tab. 4 zumindest den Insulinpeak im Ausschlußvolumen hätte erwarten können. Damit kommt auch das Sephadex G 15 als potentielles Füllmaterial für den Säulenlauf zur Trennung von Insulin, Proinsulin und C-Peptid in Betracht.

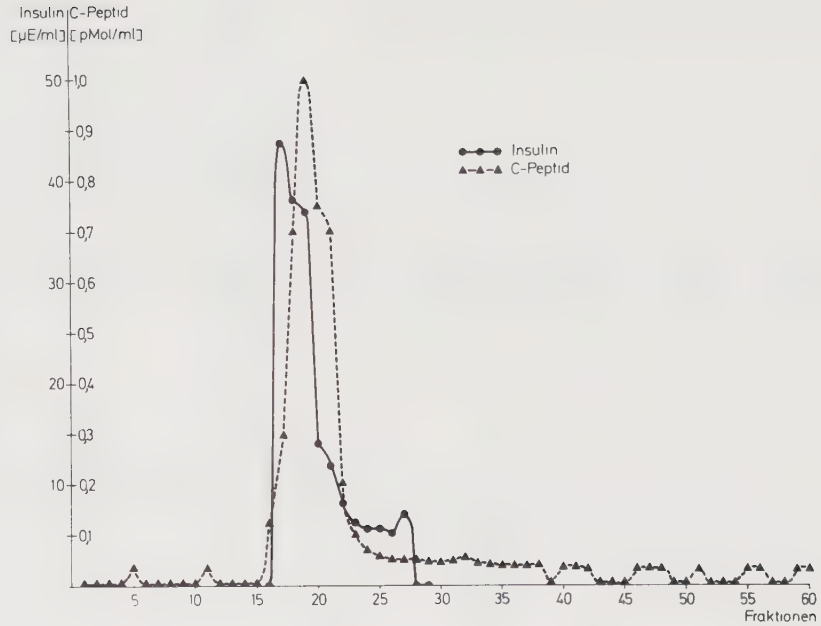

Abb. 7: Insulin- und C-Peptidbestimmung nach säulenchromatographischer Trennung (Sephadex G 15) von Patientenserum

Insulinbestimmung

Fraktion	µE/ml
15	0,000
16	0,000
17	43,814
18	38,032
19	37,096
20	13,880
21	11,729
22	8,079
23	6,308
24	5,526
25	5,518
26	4,879
27	7,036
28	0,000
29	0,000
30	0,000
Serum pur	33,437

Σ 181,7 µE/6 ml

1 ml $\hat{=}$ 30,3 µE Wiederfindung: 90,7%

C - Peptid - Bestimmung

Fraktion	pMol/ml
15	0,000
16	0,125
17	0,300
18	0,700
19	1,000
20	0,750
21	0,700
22	0,200
23	0,102
24	0,069
25	0,056
26	0,051
27	0,054
28	0,047
29	0,045
30	0,045
31	0,048
32	0,055
33	0,041
34	0,041
35	0,038
36	0,037
37	0,037
38	0,038
39	0,000
40	0,039
41	0,040
42	0,033
43	0,000

Fraktion	pMol/ml
44	0,000
45	0,000
46	0,035
47	0,035
48	0,036
49	0,000
50	0,000
Serum pur	0,107

Σ 4,6 pMol/6 ml 1 ml $\hat{=}$ 0,77 pMol

Wie der Versuch zeigt, stimmen die beiden Insulinwerte:
1. Bestimmung direkt aus dem nicht enteiweißten Serum und
2. Summation der einzelnen Fraktionen sehr gut überein.

Bei der C-Peptidbestimmung dagegen liegt der direkt aus dem Serum bestimmte Wert wesentlich unter dem, der sich aus der Summe der Fraktionen ergibt. Dieses Ergebnis zeigte sich auch bei allen weiteren Untersuchungen.

3.1.4 Insulin- und C-Peptidbestimmung in der Verdünnungsreihe

Es brachte jedoch nicht nur der Säulenlauf, sondern auch die Verdünnung der Seren, eine Erhöhung der C-Peptidwerte. Erwartungsgemäß hatte der Verdünnungsprozeß auf die Insulinwerte keinen Einfluß.

Insulinbestimmung

Serum 4		Serum 5		Serum 6	
Verdünnung	µE/ml	Verdünnung	µE/ml	Verdünnung	µE/ml
1 : 1	12,16	1 : 1	12,81	1 : 1	19,05
1 : 2	13,96	1 : 2	10,14	1 : 2	17,22
1 : 3	14,70	1 : 3	10,26	1 : 3	16,05
1 : 5	-	1 : 5	-	1 : 5	-
1 : 7	-	1 : 7	-	1 : 7	-
1 : 10	-	1 : 10	-	1 : 10	-

Die 5, 7 und 10-fache Verdünnung brachte kein Ergebnis, weil die Insulinwerte unter dem Erfassungslimit des Kits lagen.

C-Peptidbestimmung

Serum 1		Serum 2		Serum 3	
Verd.	pMol/ml	Verd.	pMol/ml	Verd.	pMol/ml
1 : 1	0,125	1 : 1	0,090	1 : 1	0,085
1 : 2	0,320	1 : 2	0,154	1 : 2	0,240
1 : 5	0,500	1 : 5	0,160	1 : 5	0,410
1 : 10	0,400	1 : 10	0,100	1 : 10	0,300

Serum 4		Serum 5		Serum 6	
Verd.	pMol/ml	Verd.	pMol/ml	Verd.	pMol/ml
1 : 1	0,150	1 : 1	0,130	1 : 1	0,175
1 : 2	0,340	1 : 2	0,280	1 : 2	0,384
1 : 3	0,510	1 : 3	0,420	1 : 3	0,510
1 : 5	0,750	1 : 5	0,500	1 : 5	0,760
1 : 7	0,770	1 : 7	0,490	1 : 7	2,230
1 : 10	0,700	1 : 10	0,500	1 : 10	1,250

Eine ideale Verdünnung von 20% wie sie für den Normbereich angenommen werden kann, gilt nicht, wenn die C-Peptidkonzentrationen darüberliegen wie im Fall 6. Hier kommt es bei

höherer Verdünnung zu einem weiteren Anstieg der C-Peptidwerte.

Die direkte Bestimmung der C-Peptidkonzentration im Serum ist, wie dieser Versuch zeigt, nicht realisierbar.

Demgegenüber scheint der Säulenlauf gleiche Voraussetzung für verschiedene C-Peptidkonzentrationen zu schaffen, so daß der Säulenchromatographie nicht nur eine Trennfunktion zukommt, sondern daß sie auch für die Bestimmung exakter C-Peptidwerte unerläßlich ist. Hochspezifische C-P-Kits könnten diese Fehlerquelle eventuell ausschließen.

3.1.5 Säulenfüllmaterial und Wiederfindung

Um die Wiederfindungsrate des C-Peptids auf den drei verschiedenen Säulen (Füllmaterial: 1) Sephadex G 50 fine, 2) G 15 und 3) G 50 superfine) zu bestimmen, wurde jeweils ein Milliliter einer definierten Probe (1 pMol C-Peptid/ml) aufgetragen. Es wurden die Fraktionen 1 - 40 gefriergetrocknet und deren Gehalt an C-Peptid gemessen.

Sephadex G 50 fine

Fraktion	pMol/ml	Fraktion	pMol/ml
15	0,000	21	0,210
16	0,000	22	0,250
17	0,000	23	0,140
18	0,000	24	0,025
19	0,025	25	0,000
20	0,100	26	0,000

Σ 0,750 pMol $\hat{=}$ Wiederfindungsrate von 75%

Sephadex G 15

Fraktion	pMol/ml	Fraktion	pMol/ml
15	0,000	22	0,112
16	0,055	23	0,100
17	0,130	24	0,110
18	0,130	25	0,075
19	0,130	26	0,025
20	0,115	27	0,000
21	0,115	28	0,000

$\sum$ 1,087 pMol $\triangleq$ Wiederfindungsrate von 100%

Sephadex G 50 superfine

Fraktion	pMol/ml	Fraktion	pMol/ml
23	0,000	29	0,170
24	0,000	30	0,100
25	0,020	31	0,030
26	0,075	32	0,000
27	0,135	33	0,000
28	0,210		

$\sum$ 0,74 pMol $\triangleq$ Wiederfindung von 74%

Von den drei Sephadex-Typen hatte das Füllmaterial G 15 die für C-Peptid beste Wiederfindungsrate.

3.1.6 Säulenfüllmaterial und Trennqualität

Entscheidend für die Wahl des Füllmaterials sollte jedoch dessen Trennqualität sein.

Drei Säulen (V = 100 ml) wurden mit Sephadex G 50 fine, G 15 und G 50 superfine gefüllt, äquilibriert und nacheinander mit markiertem Insulin, Proinsulin und C-Peptid beschickt. Der Säulenlauf 100 Tropfen/Glas $\triangleq$ 2,6 ml war in allen neun Durch-

gängen identisch. Die einzelnen Fraktionen wurden direkt in den Zählröhrchen aufgefangen und diese zur Radioaktivitätsbestimmung in das Szintillationsspektrometer gestellt. Jedes Gläschen wurde 1 min gezählt und dann die entsprechenden Counts gegen die Fraktionen aufgetragen. Es ergaben sich daraus die Kurven der Abbildungen 8, 9 und 10. Aus dem Versuch geht eindeutig hervor, daß die beste Trenneigenschaft dem Gel Sephadex G 50 superfine zukommt; der Proinsulinpeak ist klar von den beiden anderen Komponenten abgetrennt. Eine Trennung von Insulin und C-Peptid ist von untergeordneter Bedeutung, da beide Substanzen nebeneinander bestimmt werden können. Bei dem Füllmaterial G 50 fine ist die Trennung von Proinsulin und Insulin weit weniger effektiv, was aufgrund des größeren mittleren Teilchendurchmessers des Gels auch zu erwarten ist. Damit war dieses Füllmaterial für unsere Versuchsanordnung nicht akzeptabel.

Wie Abb. 9 zeigt, werden die drei Komponenten Insulin, Proinsulin und C-Peptid von Sephadex G 15 nicht getrennt. Alle drei Peaks sind scharf überlagert.

Um sicher zu gehen, daß eine Trennung auch erfolgt, wenn ein Gemisch der Komponenten vorliegt, wie es im Serum der Fall ist, wurde eine Mischung aus je 100 µl markiertem Insulin und Proinsulin auf die Säule Sephadex G 50 sf aufgetragen. Die erzielte Trennung ist nicht so eindeutig, da die gewählte Aktivität etwas zu hoch lag (Abb. 11).

Der Versuch wurde mit einer Mischung aus definierten Mengen unmarkiertem Insulin und Proinsulin wiederholt.

Wie Abb. 12 zeigt, erscheinen die beiden Komponenten nacheinander im Eluat und es ist damit eine eindeutige Trennung gewährleistet.

Da in der neueren Literatur immer häufiger das Polyacrylamid Biogel P-30 (mesh 100 - 200) zur Fraktionierung verwendet wird, wurde dieses Gel auch von uns auf seine Trenneigenschaft untersucht.

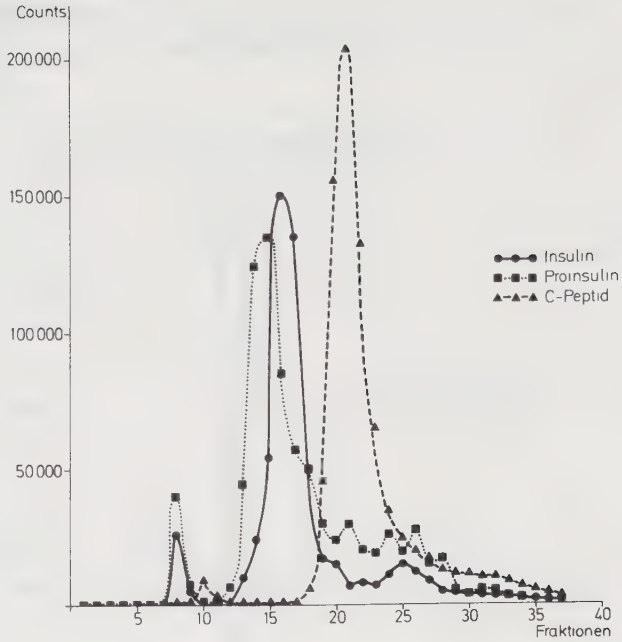

Abb. 8: Säulenchromatographie (Sephadex G 50 fine) von radioaktiv markiertem Insulin, Proinsulin und C-Peptid

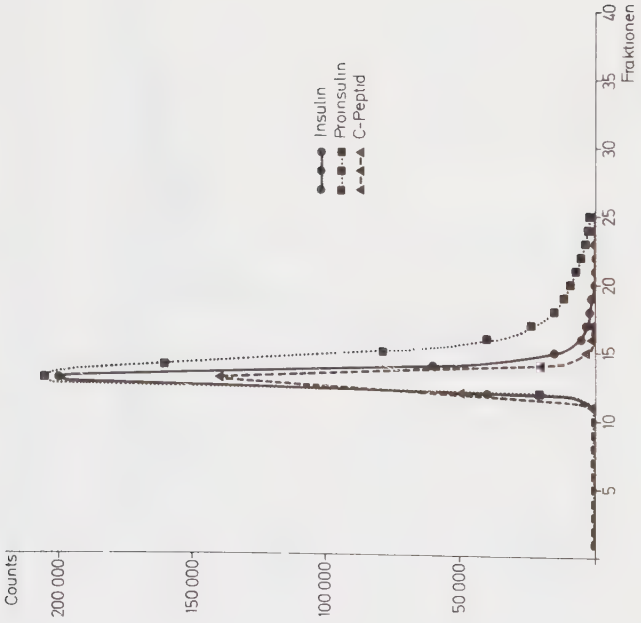

Abb. 9: Säulenchromatographie (Sephadex G 15) von radioaktiv markiertem Insulin, Proinsulin und C-Peptid

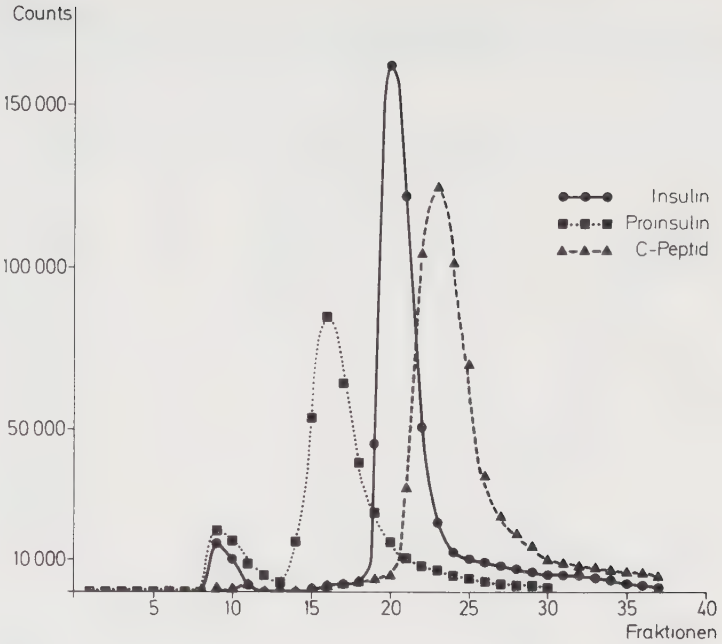

Abb. 10: Säulenchromatographie (Sephadex G 50 superfine) von radioaktiv markiertem Insulin, Proinsulin und C-Peptid

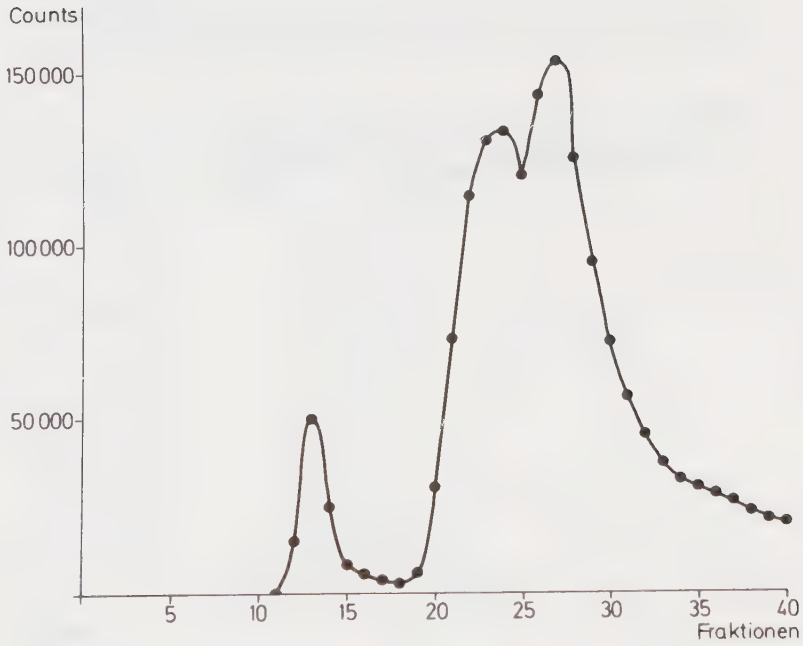

Abb. 11: Säulenchromatographie (Sephadex G 50 superfine) von einer Mischung aus radioaktiv markiertem Insulin und Proinsulin

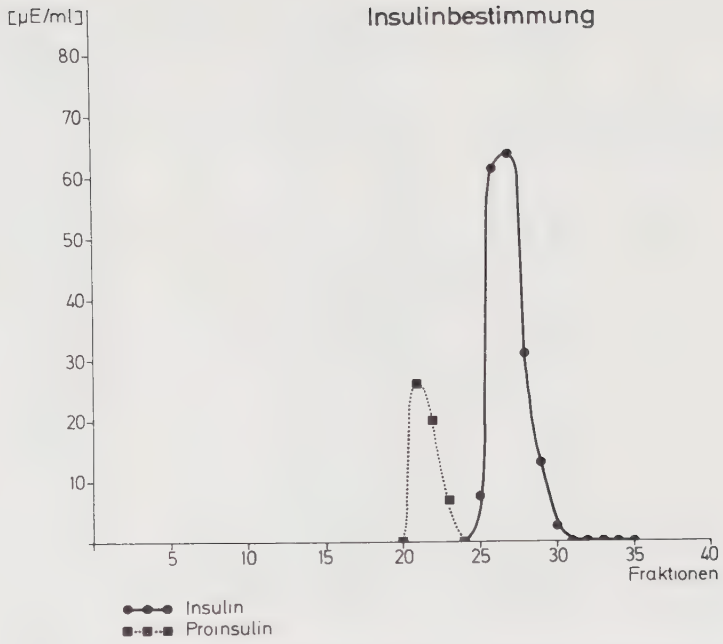

Abb. 12: Insulinbestimmung nach säulenchromatographischer Trennung (Sephadex G 50 superfine) einer Mischung aus definierten Mengen unmarkiertem Insulin und Proinsulin

Abb. 13 zeigt, daß die Qualität der Trennung von Insulin und Proinsulin hinter der des Gels Sephadex G 50 sf zurückfällt.

Ein weiterer Versuch das Biogel P-30, allerdings mit der mesh-Zahl 400, einzusetzen, schlug fehl, da die Säule zu groß war und der Säulenrun daher unverhältnismäßig lange dauerte (60 h). Es wäre jedoch interessant, diesen Versuch mit einer kleineren Säule und unter anderen Bedingungen zu wiederholen.

Nachdem die Entscheidung zu Gunsten des Sephadex G 50 sf als Säulenfüllmaterial getroffen war, wurden auf diese Säule 5 ml enteiweißtes Patientenserum aufgetragen.

Abb. 14 zeigt zwei definierte Peaks, die wir zunächst als Proinsulin- und Insulinpeak interpretieren. Um diese Aussage zu erhärten, wurde dasselbe Serum einmal vermischt mit markiertem Insulin und zum zweiten vermischt mit markiertem Proinsulin auf die Säule gegeben.

Wie Abb. 15 und 16 zeigen, überlappt der radioaktive Proinsulinpeak den ersten Peak der Serumkurve, der radioaktive Insulinpeak dagegen ist deckungsgleich mit dem zweiten Serumpeak. Damit können die beiden Peaks der Serumkurve eindeutig als Proinsulin und Insulin eingeordnet werden.

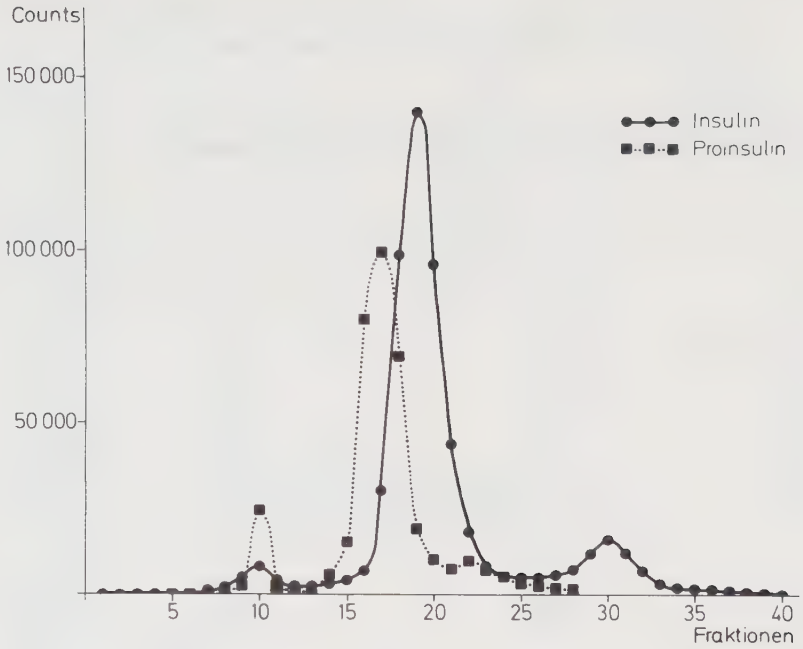

Abb. 13: Säulenchromatographie (Biogel P-30, mesh 100 - 200) von radioaktiv markiertem Insulin und Proinsulin

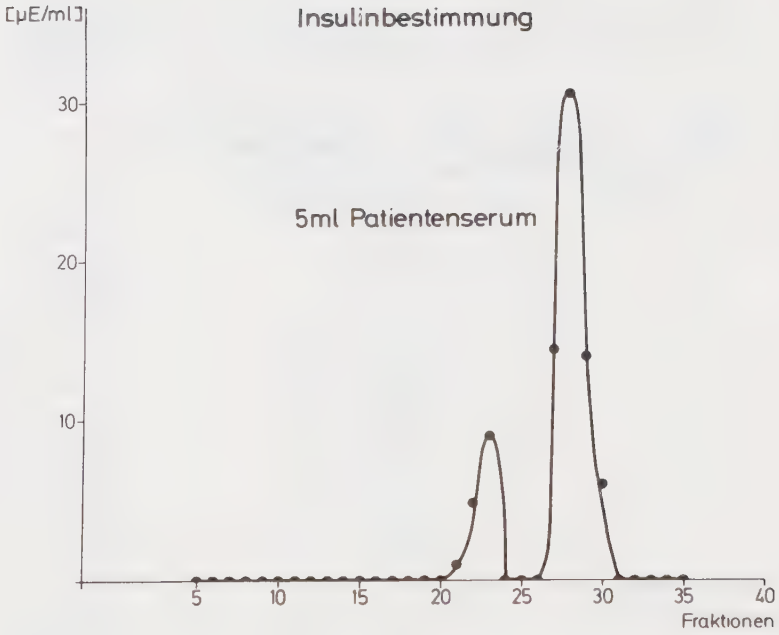

Abb. 14: Insulinbestimmung nach säulenchromatographischer Trennung (Sephadex G 50 superfine) von Patientenserum

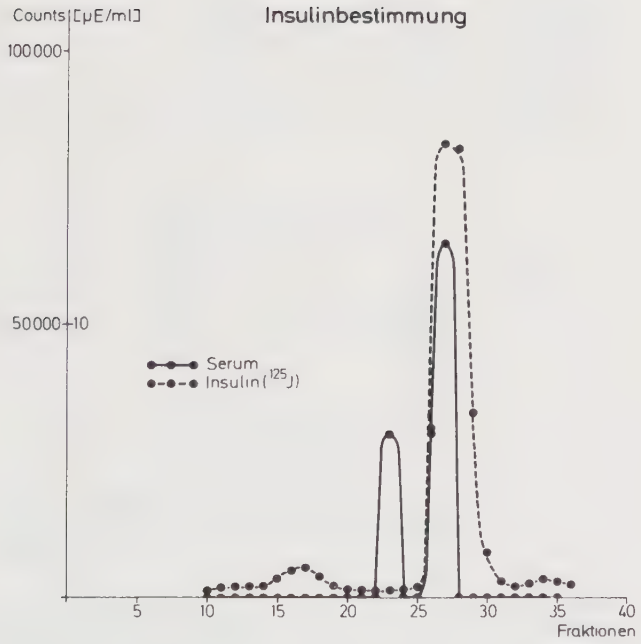

Abb. 15: Säulenchromatographie (Sephadex G 50 superfine) von radioaktiv markiertem Insulin und Patientenserum mit anschließender Insulinbestimmung

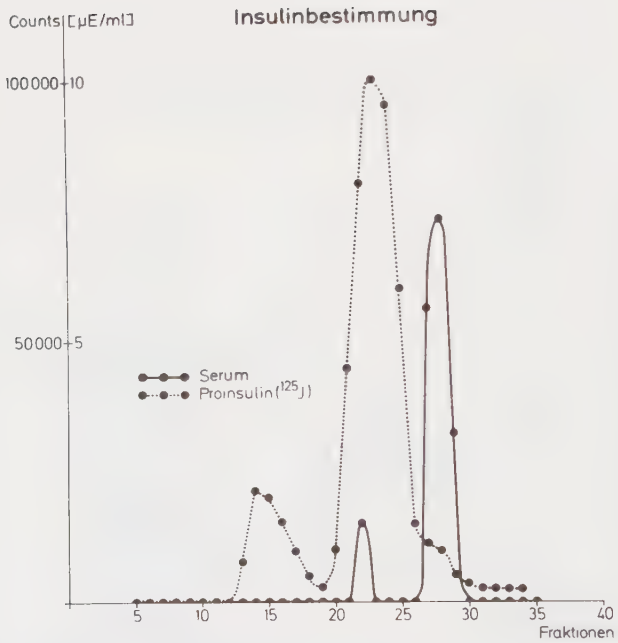

Abb. 16: Säulenchromatographie (Sephadex G 50 superfine) von radioaktiv markiertem Proinsulin und Patientenserum mit anschließender Insulinbestimmung

3.1.7 Insulin- und C-Peptidbestimmung nach Reduzierung der Serummenge

Zu klären war nun, ob die in der Versuchsanordnung zu verwendende Serummenge auf 2 ml reduziert werden konnte, ohne quantitative Einbußen im Gesamtergebnis befürchten zu müssen.

Es wurden 3 Chargen eines Patientenserums à 10 ml, 5 ml und 2 ml enteiweißt und auf eine frisch mit Sephadex G 50 sf gefüllte, äquilibrierte und geeichte Säule aufgetragen. In den einzelnen Fraktionen wurde Insulin und C-Peptid bestimmt (Abb. 17, 18, 19).

Insulinbestimmung

1. 10 ml Patientenserum

Fraktion	µE/ml	Fraktion	µE/ml
10	0,0	23	10,0
11	0,0	24	5,0
12	0,0	25	8,5
13	0,0	26	3,5
14	25,0	27	9,0
15	30,0	28	13,5
16	27,5	29	15,0
17	8,0	30	11,0
18	56,3	31	5,0
19	102,0	32	3,5
20	65,0	33	2,0
21	32,5	34	1,5
22	18,4	35	1,0

$\sum$ 380 µE / 10 ml

Serum pur: 49,7 µE/ml

49,7 x 10 = 497

497 : 100% = 380 : x

x = 76,5% Wiederfindungsrate

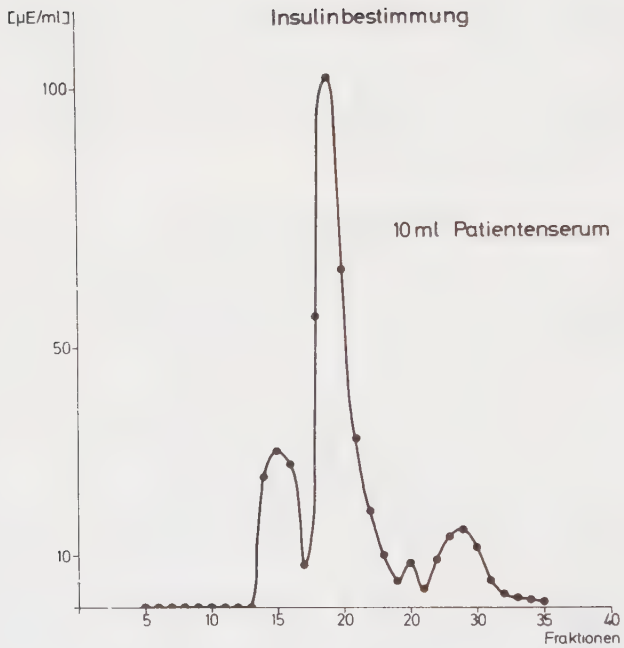

Abb. 17: Insulinbestimmung nach Säulenchromatographie (Sephadex G 50 superfine) von 10 ml Patientenserum

2. 5 ml Patientenserum

Fraktion	µE/ml	Fraktion	µE/ml
6	1,7	19	25,1
7	1,7	20	61,0
8	3,3	21	57,1
9	6,0	22	16,6
10	8,0	23	7,0
11	6,6	24	8,0
12	1,0	25	3,6
13	2,0	26	6,3
14	5,0	27	20,0
15	12,6	28	7,0
16	21,0	29	4,0
17	19,0	30	2,0
18	6,0	31	1,0
		32	0,0

$\sum$ 222,4 µE / 5 ml

Serum pur: 51,4 µE/ml

51,4 x 5 = 257

257 : 100% = 222,4 : x

x = 86,5% Wiederfindungsrate

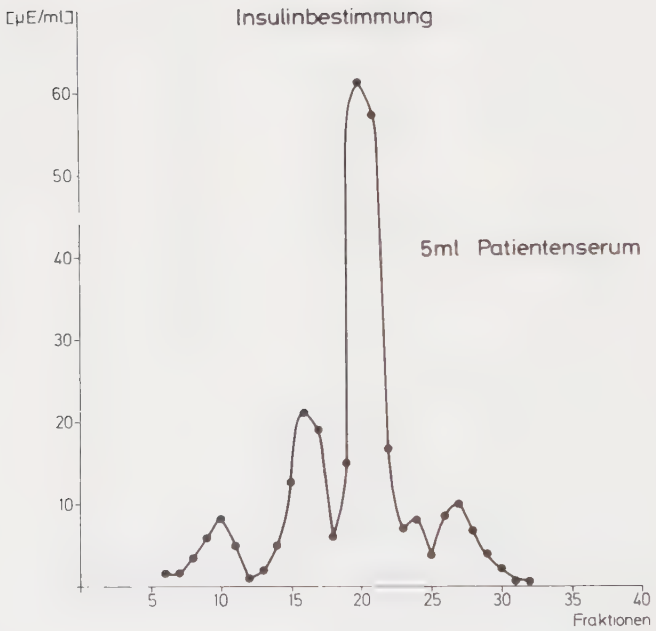

Abb. 18: Insulinbestimmung nach Säulenchromatographie (Sephadex G 50 superfine) von 5 ml Patientenserum

3. 2 ml Patientenserum

Fraktion	µE/ml	Fraktion	µE/ml
8	1,3	20	12,0
9	3,0	21	11,7
10	3,8	22	10,0
11	2,3	23	6,0
12	1,5	24	3,0
13	2,5	25	3,8
14	5,0	26	4,2
15	7,5	27	3,6
16	6,5	28	3,2
17	4,0	29	3,5
18	5,0	30	3,0
19	10,0	31	2,0

$\sum$ 84,7 µE / 2 ml

Serum pur: 55 µE/ml

55 x 2 = 110

110 : 100% = 84,7 : x

x = 77 % Wiederfindungsrate

Die 3 Kurven (Abb. 17, 18, 19) zeigen eine recht gute Übereinstimmung, obgleich der Kurvenverlauf der 2 ml Charge noch etwas undefiniert ist.

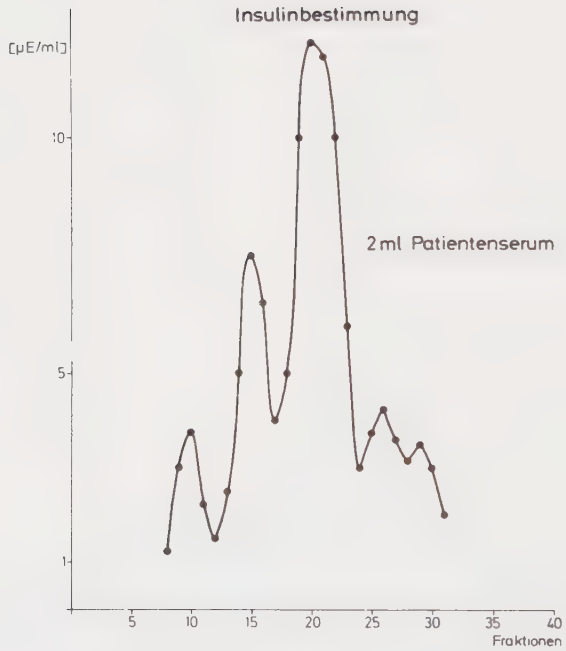

Abb. 19: Insulinbestimmung nach Säulenchromatographie (Sephadex G 50 superfine) von 2 ml Patientenserum

C-Peptidbestimmung

1. 10 ml Patientenserum

Fraktion	pMol/ml	Fraktion	pMol/ml
12	0,000	22	0,030
13	0,030	23	0,025
14	0,035	24	0,010
15	0,080	25	0,005
16	0,140	26	0,000
17	1,000	27	0,010
18	1,200	28	0,010
19	1,180	29	0,005
20	1,100	30	0,000
21	0,700	31	0,000

$\sum$ 5,6 pMol / 10 ml

2. 5 ml Patientenserum

Fraktion	pMol/ml	Fraktion	pMol/ml
15	0,000	21	1,180
16	0,015	22	0,325
17	0,015	23	0,025
18	0,020	24	0,005
19	0,350	25	0,005
20	1,200	26	0,000

$\sum$ 3,14 pMol / 5 ml

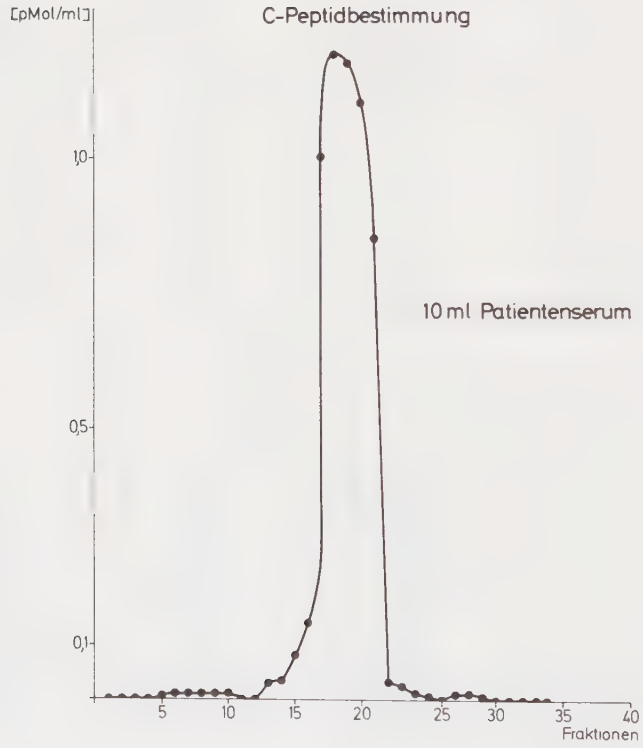

Abb. 20: C-Peptidbestimmung nach Säulenchromatographie (Sephadex G 50 superfine) von 10 ml Patientenserum

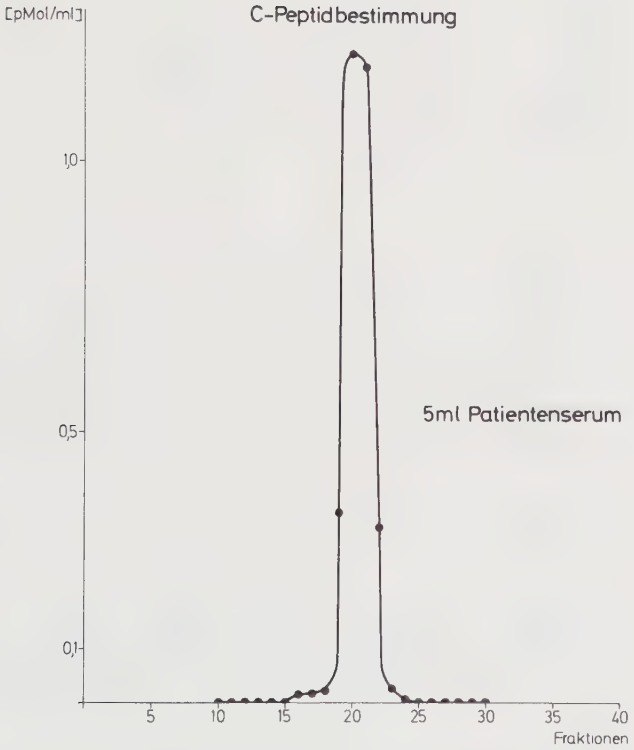

Abb. 21: C-Peptidbestimmung nach Säulenchromatographie (Sephadex G 50 superfine) von 5 ml Patientenserum

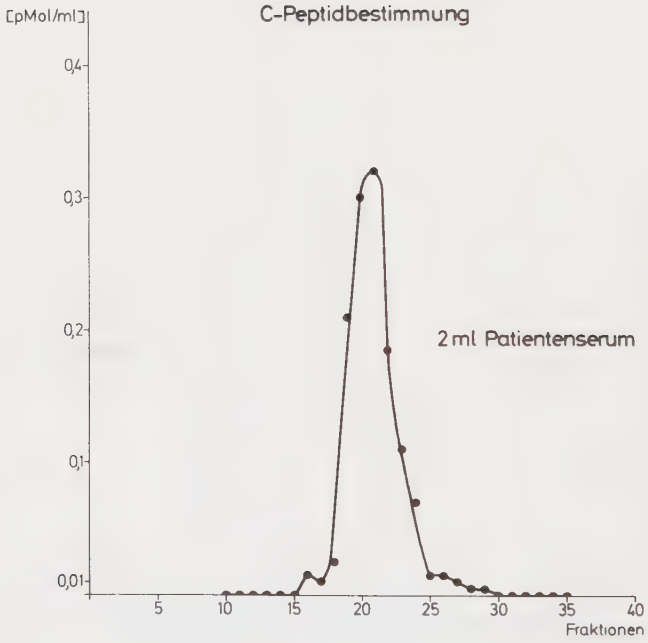

Abb. 22: C-Peptidbestimmung nach Säulenchromatographie (Sephadex G 50 superfine) von 2 ml Patientenserum

3. 2 ml Patientenserum

Fraktion	pMol/ml	Fraktion	pMol/ml
15	0,000	23	0,110
16	0,015	24	0,070
17	0,010	25	0,015
18	0,025	26	0,015
19	0,210	27	0,010
20	0,300	28	0,005
21	0,320	29	0,005
22	0,185	30	0,000

$\sum$ 0,130 pMol / 2 ml

Da bei der C-Peptidbestimmung (Abb. 20, 21, 22) keine Wiederfindungsrate ermittelt werden konnte, wurden die drei Ergebnisse direkt miteinander verglichen. Die Werte für den 10 ml und 5 ml Versuch lagen etwas zu niedrig, was dadurch zu erklären war, daß die Werte, die über 1 pMol/ml lagen, geschätzt werden mußten und wahrscheinlich nicht hoch genug angesetzt wurden.

Abgesehen von den geringen Abweichungen stimmten die Ergebnisse jedoch sehr gut überein.

Um die letzten Verunreinigungen im Verlauf der Proinsulin- und Insulinkurve zu eliminieren (Abb. 19), wurden die Serum-Extraktion und auch der Gefriertrocknungsprozeß noch einmal optimiert.

Es wurde eine neue Säule mit Sephadex G 50 sf gefüllt, äquilibriert, geeicht und 2 ml enteiweißtes Serum aufgetragen.

Der Kurvenverlauf war einwandfrei, die Trennung der Peaks sehr scharf und auch die Wiederfindungsrate recht zufriedenstellend (Abb. 23).

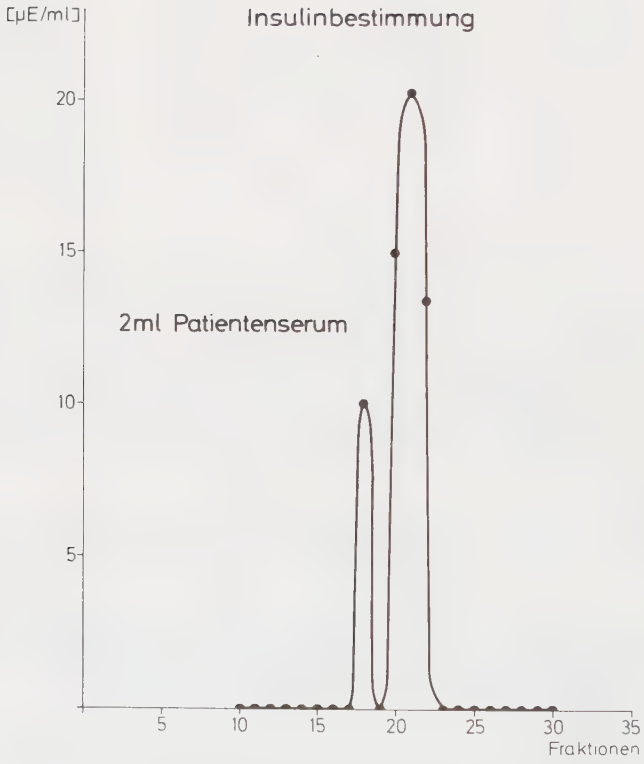

Abb. 23: Insulinbestimmung nach säulenchromatographischer Trennung (Sephadex G 50 superfine) von 2 ml Patientenserum

Insulinbestimmung

2 ml Patientenserum

Fraktion	µE/ml
17	0,000
18	10,012
19	0,000
20	14,979
21	20,210
22	13,395
23	0,000

Σ 58, 6 µE / 2 ml

Serum pur: 38,8 µE/ml

38,8 x 2 = 77,6

77,6 : 100% = 58,6 : x

x = 76 % Wiederfindung

Wie wir bei der C-Peptidbestimmung gesehen haben, können die Werte einzelner Fraktionen über den Standardkurvenbereich von 1 pMol/ml hinausgehen. Um das zu vermeiden, sollten die Fraktionen nach dem Lyophilisieren in adäquaten Mengen Phosphat-Puffer gelöst werden. Solche Verdünnungen können dann auch höhere C-Peptidkonzentrationen voll erfassen.

3.1.8 Lösen der Fraktionen zur Insulin- und C-Peptidbestimmung

Um einen Hinweis auf die optimale Puffermenge zu bekommen, wurde das Serum von 4 Zeitpunkten (0', 30', 60' und 120') eines oralen Glukosebelastungstests in 2 Chargen zu je 2 ml aufgeteilt. Sie wurden enteiweißt und über die Säule (Sephadex G 50 sf) gegeben. Die Fraktionen wurden gefriergetrocknet und dann einmal in 1 ml Puffer und zum andern in

2 ml Puffer gelöst.

Bei der C-Peptidbestimmung stimmten die Werte der beiden Chargen nach entsprechender Umrechnung ausgezeichnet überein. Die Korrelation bei der Insulinbestimmung war wesentlich schlechter. Der entsprechende 2 ml Wert lag weit unter dem der 1 ml Charge.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für die Versuchsanordnung folgende Verdünnung vereinbart.
Die Fraktionen werden zunächst in 1 ml Puffer gelöst; aus dieser Lösung werden dann die Insulinwerte bestimmt. Nach weiterer Verdünnung 1 : 1 mit Phosphat-Puffer werden die C-Peptidkonzentrationen ermittelt.

An dieser Stelle sollte noch einmal hervorgehoben werden, daß der Schwerpunkt der Arbeit auf dem Erstellen der Methode lag und erst damit die Voraussetzung zur Bestimmung von C-Peptid und Insulin im Serum bei den klinikäblichen Glukose-Toleranz-Tests gegeben war.

3.2 Insulin- und C-Peptidwerte im intravenösen Tolbutamid-Test

Die folgenden Tabellen und Graphiken zeigen die Insulin- und C-Peptidserumspiegel der Patienten 1, 2, 4 und 5 im intravenösen Tolbutamid-Test. Nach säulenchromatographischer Abtrennung des Proinsulins, mittels der von uns erstellten Versuchsanordnung, wurden die Meßwerte der Insulin- und C-Peptidbestimmung (Tab. 5 - 12) und die sich daraus ergebenden Elutionsdiagramme (Abb. 24, 26, 28 und 30) erhalten.

In den Abb. 25, 27, 29 und 31 sind die aus der Summe der Einzelwerte (Tab. 5 - 12) errechneten Insulin- und C-Peptidserumspiegel als Funktion der Zeit aufgetragen.

Um eine Bezugsgröße für die Kurvenverläufe der beiden Komponenten Insulin und C-Peptid zu haben, wurde die Blutzuckerkurve des Tolbutamid-Tests mit in die Abbildungen (Abb. 25, 27, 29 und 31) eingezeichnet.

Frakt.	0'		2'		5'		10'		20'		40'		60'	
Nr.	µE/ml	ng/ml	µE/ml	ng/ml	µE/ml	ng/ml	µE/ml	ng/ml	µE/ml	ng/ml	µE/ml	ng/ml	µE/ml	ng/ml
17	0,00	0,00	0,00	0,00	1,87	0,09	0,00	0,00	2,53	0,12	0,00	0,00	0,00	0,00
18	1,82	0,08	0,00	0,00	3,06	0,14	1,65	0,08	2,58	0,12	0,00	0,00	0,00	0,00
19	3,14	0,14	25,42	1,16	7,92	0,36	2,38	0,11	4,38	0,20	1,92	0,09	0,00	0,00
20	3,72	0,17	56,45	2,57	28,37	1,29	3,42	0,16	4,36	0,20	2,06	0,09	0,70	0,03
21	5,84	0,27	63,93	2,91	29,84	1,36	11,11	0,51	3,64	0,17	3,50	0,16	1,39	0,06
22	3,68	0,17	30,86	1,40	27,56	1,25	15,92	0,72	2,49	0,11	3,79	0,17	4,33	0,20
23	2,44	0,12	16,11	0,73	18,34	0,83	12,80	0,58	2,11	0,10	2,76	0,13	4,57	0,21
24	1,93	0,88	8,12	0,37	11,25	0,51	8,68	0,39	1,05	0,05	1,93	0,09	1,16	0,05
25	0,00	0,00	4,61	0,21	8,78	0,40	6,52	0,30	0,00	0,00	0,74	0,03	0,78	0,04
26	0,00	0,00	4,10	0,19	7,57	0,34	4,58	0,21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	22,57	1,04	209,60	9,54	144,56	6,57	67,06	3,05	23,14	1,06	16,70	0,76	12,93	0,59

Tab. 5 : Insulinwerte (µE/ml u. ng/ml) im Tolbutamidtest (1 g Tolbutamid i.v.) bei einem Patienten mit ausgeprägter Leberzellverfettung nach säulenchromatographischer Abtrennung des Proinsulins (Sephadex G 50 superfine).

Frakt.	0'		2'		5'		10'		20'		40'		60'	
Nr.	pM/ml	ng/ml	pM/ml	ng/ml	pM/ml	ng/ml	pM/ml	ng/ml	pM/ml	ng/ml	pM/ml	ng/ml	pM/ml	ng/ml
18	0,00	0,00	0,02	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
19	0,08	0,24	0,36	1,08	0,07	0,21	0,00	0,00	0,01	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00
20	0,12	0,36	0,42	1,27	0,36	1,09	0,06	0,18	0,06	0,18	0,03	0,08	0,00	0,00
21	0,07	0,21	0,52	1,57	0,36	1,10	0,27	0,82	0,06	0,19	0,13	0,39	0,04	0,12
22	0,03	0,09	0,37	1,12	0,36	1,09	0,25	0,76	0,06	0,18	0,15	0,45	0,10	0,30
23	0,01	0,03	0,25	0,76	0,25	0,76	0,21	0,63	0,04	0,12	0,12	0,36	0,07	0,21
24	0,00	0,00	0,11	0,33	0,10	0,30	0,14	0,42	0,01	0,03	0,10	0,30	0,06	0,18
25	0,00	0,00	0,08	0,24	0,07	0,21	0,07	0,21	0,00	0,00	0,04	0,12	0,03	0,09
26	0,00	0,00	0,02	0,06	0,02	0,06	0,01	0,03	0,00	0,00	0,03	0,09	0,00	0,00
27	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,06	0,00	0,00
28	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,03	0,00	0,00
	0,31	0,93	2,15	6,50	1,59	4,82	1,01	3,05	0,24	0,73	0,63	1,88	0,30	0,90

Tab. 6 : C-Peptidwerte (pMol/ml u. ng/ml) im Tolbutamidtest (1 g Tolbutamid i.v.) bei einem Patienten mit ausgeprägter Leberzellverfettung nach säulenchromatographischer Abtrennung des Proinsulins (Sephadex G 50 superfine).

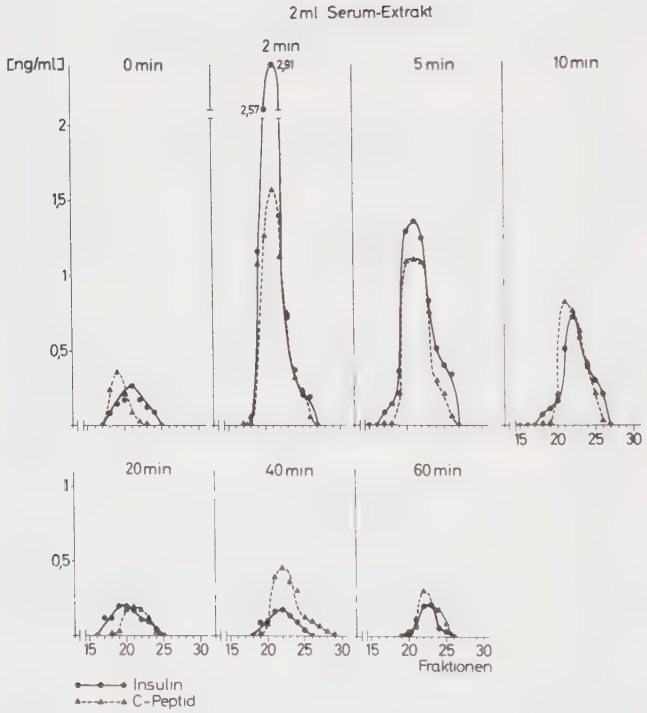

Abb. 24: Insulin- (IRI) und C-Peptidelutionsdiagramme (IRCP) nach säulenchromatographischer Abtrennung des Proinsulins (Sephadex G 50 superfine) im Tolbutamidtest bei einem Patienten mit ausgeprägter Leberzellverfettung

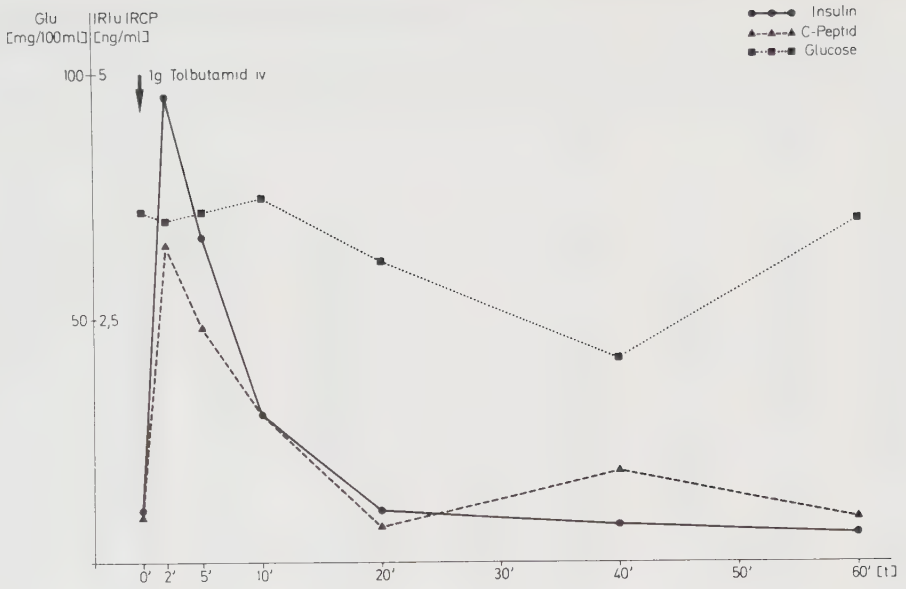

Abb. 25: Glucose (Glu), Insulin (IRI) und C-Peptid (IRCP) nach Applikation von 1 g Tolbutamid iv. bei einem Patienten mit ausgeprägter Leberzellverfettung

Frakt.	0'		2'		5'		10'		20'		40'		60'	
Nr.	µE/ml	ng/ml	µE/ml	ng/ml	µE/ml	ng/ml	µE/ml	ng/ml	µE/ml	ng/ml	µE/ml	ng/ml	µE/ml	ng/ml
17	0,00	0,00	0,00	0,00	1,13	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
18	0,00	0,00	16,57	0,75	6,32	0,29	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,72	0,08
19	2,05	0,09	19,49	0,89	23,10	1,05	11,31	0,51	4,96	0,23	3,77	0,17	3,40	0,15
20	6,87	0,31	14,75	0,67	14,84	0,67	22,90	1,04	15,71	0,71	10,81	0,49	8,92	0,41
21	1,02	0,05	11,62	0,53	10,37	0,47	22,04	1,00	12,28	0,56	1,42	0,07	0,84	0,04
22	0,00	0,00	11,19	0,51	8,19	0,37	8,81	0,40	9,12	0,41	0,00	0,00	0,00	0,00
23	0,00	0,00	6,80	0,31	7,43	0,34	8,34	0,38	5,42	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00
24	0,00	0,00	3,47	0,16	4,36	0,20	4,92	0,22	1,75	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00
25	0,00	0,00	1,55	0,07	3,74	0,17	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
26	0,00	0,00	0,00	0,00	2,42	0,11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
27	0,00	0,00	0,00	0,00	1,65	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
28	0,00	0,00	0,00	0,00	1,01	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	9,94	0,45	85,44	3,89	84,56	3,84	78,32	3,55	49,24	2,24	16,00	0,72	14,88	0,68

Tab. 7 : Insulinwerte (µE/ml u. ng/ml) im Tolbutamidtest (1 g Tolbutamid i.v.) bei einem Patienten mit latentem Diabetes mellitus und einer Leberfibrose nach säulenchromatographischer Abtrennung des Proinsulins (Sephadex G 50 superfine).

Frakt.	0'		2'		5'		10'		20'		40'		60'	
Nr.	pM/ml	ng/ml	pM/ml	ng/ml	pM/ml	ng/ml	pM/ml	ng/ml	pM/ml	ng/ml	pM/ml	ng/ml	pM/ml	ng/ml
15	0,00	0,00	0,03	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
16	0,00	0,00	0,03	0,09	0,00	0,00	0,01	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
17	0,00	0,00	0,04	0,11	0,00	0,00	0,02	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
18	0,10	0,30	0,55	1,65	0,25	0,76	0,03	0,09	0,00	0,00	0,02	0,06	0,00	0,00
19	0,26	0,79	0,90	2,70	0,80	2,42	0,34	1,03	0,19	0,56	0,33	0,98	0,34	1,03
20	0,23	0,69	0,41	1,24	0,47	1,42	1,40	4,23	0,72	2,18	0,59	1,78	0,49	1,48
21	0,15	0,45	0,41	1,24	0,36	1,09	0,70	2,11	0,55	1,66	0,40	1,21	0,25	0,76
22	0,12	0,36	0,39	1,16	0,34	1,03	0,34	1,03	0,37	1,12	0,35	1,06	0,15	0,45
23	0,10	0,30	0,26	0,79	0,29	0,88	0,30	0,91	0,29	0,86	0,22	0,66	0,09	0,27
24	0,08	0,24	0,09	0,27	0,20	0,60	0,24	0,73	0,20	0,60	0,14	0,41	0,07	0,21
25	0,06	0,18	0,09	0,27	0,16	0,48	0,17	0,50	0,15	0,45	0,07	0,21	0,04	0,11
26	0,05	0,15	0,09	0,27	0,12	0,35	0,09	0,26	0,12	0,36	0,06	0,18	0,02	0,06
27	0,00	0,00	0,05	0,15	0,05	0,15	0,04	0,11	0,08	0,24	0,03	0,09	0,02	0,06
28	0,00	0,00	0,03	0,09	0,04	0,11	0,04	0,11	0,04	0,12	0,03	0,08	0,02	0,06
29	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	0,11	0,02	0,06	0,03	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00
30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,06	0,02	0,06	0,02	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00
	1,15	3,46	3,35	11,o5	3,13	9,46	3,74	11,30	2,75	8,29	2,25	6,78	1,49	4,49

Tab. 8 : C-Peptidwerte (pMol/ml u. ng/ml) im Tolbutamidtest (1 g Tolbutamid i.v.) bei einem Patienten mit latentem Diabetes mellitus und einer Leberfibrose nach säulenchromatographischer Abtrennung des Proinsulins (Sephadex G 50 superfine).

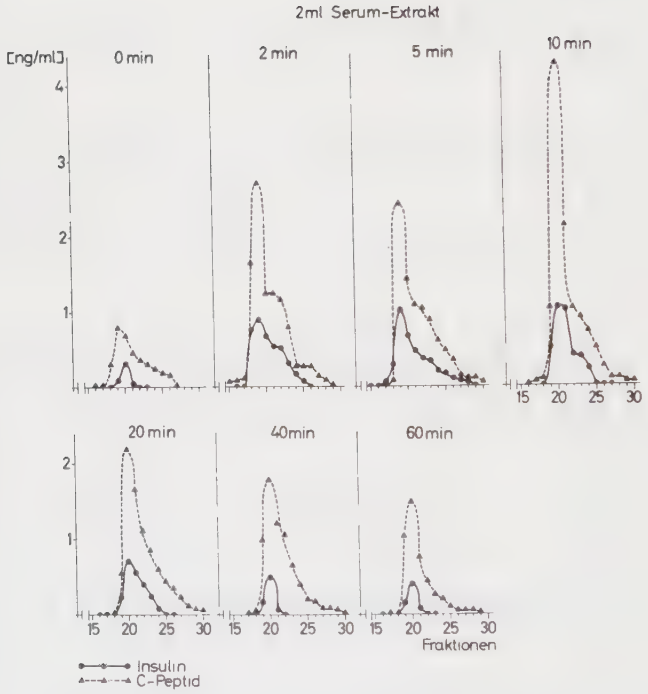

Abb. 26: Insulin- (IRI) und C-Peptidelutionsdiagramme (IRCP) nach säulenchromatographischer Abtrennung des Proinsulins (Sephadex G 50 superfine) im Tolbutamidtest bei einem Patienten mit latentem Diabetes mellitus und einer Leberfibrose

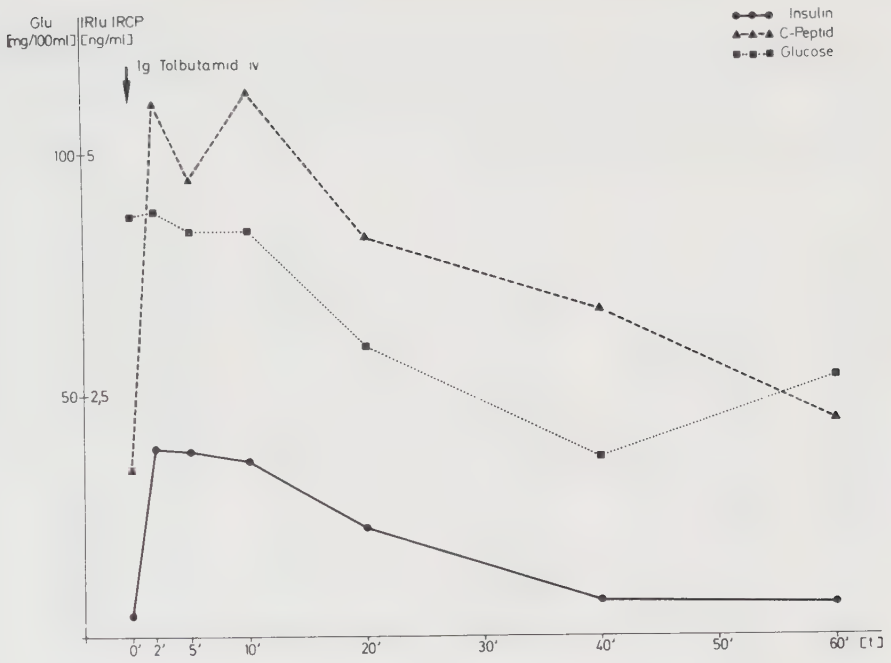

Abb. 27: Glucose (Glu), Insulin (IRI) und C-Peptid (IRCP) nach Applikation von 1 g Tolbutamid iv. bei einem Patienten mit latentem Diabetes mellitus und einer Leberfibrose

Frakt.	0'		2'		5'		10'		20'		40'		60'	
Nr.	µE/ml	ng/ml	µE/ml	ng/ml	µE/ml	ng/ml	µE/ml	ng/ml	µE/ml	ng/ml	µE/ml	ng/ml	µE/ml	ng/ml
17	1,80	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	1,60	0,07	0,00	0,00	1,04	0,05	0,00	0,00
18	2,60	0,12	8,60	0,39	6,90	0,31	3,90	0,18	0,00	0,00	2,50	0,11	0,00	0,00
19	3,30	0,15	28,50	1,30	18,60	0,85	9,30	0,42	11,90	0,54	3,20	0,15	2,59	0,12
20	2,50	0,11	17,30	0,79	7,20	0,33	7,10	0,32	8,70	0,40	2,10	0,09	4,63	0,21
21	2,50	0,11	7,20	0,33	2,40	0,11	3,40	0,16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,93	0,04
22	0,00	0,00	2,90	0,13	2,10	0,10	2,00	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
23	0,00	0,00	2,70	0,12	2,08	0,09	1,30	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
24	0,00	0,00	2,10	0,09	1,40	0,06	1,30	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
25	0,00	0,00	1,90	0,09	0,00	0,00	1,00	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
26	0,00	0,00	1,60	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
27	0,00	0,00	1,10	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	12,70	0,57	73,90	3,38	40,68	1,85	30,90	1,41	20,60	0,94	8,85	0,40	8,15	0,37

Tab. 9: Insulinwerte (µE/ml u. ng/ml) im Tolbutamidtest (1 g Tolbutamid i.v.) bei einem Patienten mit bioptisch gesicherter Leberzellverfettung und einem latenten Diabetes mellitus nach säulenchromatographischer Abtrennung des Proinsulins (Sephadex G 50 superfine).

Frakt.	0'		2'		5'		10'		20'		40'		60'	
Nr.	pM/ml	ng/ml	pM/ml	ng/ml	pM/ml	ng/ml	pM/ml	ng/ml	pM/ml	ng/ml	pM/ml	ng/ml	pM/ml	ng/ml
15	0,00	0,00	0,04	0,12	0,02	0,06	0,02	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
16	0,00	0,00	0,10	0,30	0,04	0,12	0,04	0,12	0,04	0,12	0,00	0,00	0,00	0,00
17	0,00	0,00	0,14	0,42	0,10	0,30	0,04	0,12	0,04	0,12	0,03	0,09	0,00	0,00
18	0,04	0,12	0,44	1,33	0,25	0,76	0,32	0,96	0,18	0,54	0,29	0,88	0,13	0,38
19	0,34	1,04	0,85	2,57	0,85	2,57	0,68	2,05	0,50	1,51	0,54	1,63	0,30	0,91
20	0,33	0,99	0,68	2,05	0,59	1,78	0,58	1,75	0,43	1,30	0,24	0,73	0,26	0,79
21	0,08	0,24	0,25	0,76	0,28	0,85	0,25	0,76	0,28	0,85	0,10	0,30	0,20	0,60
22	0,06	0,18	0,20	0,60	0,11	0,33	0,21	0,63	0,15	0,44	0,09	0,27	0,12	0,36
23	0,05	0,15	0,16	0,48	0,12	0,36	0,07	0,20	0,07	0,21	0,04	0,12	0,07	0,21
24	0,04	0,12	0,13	0,38	0,11	0,33	0,04	0,12	0,07	0,21	0,04	0,12	0,04	0,12
25	0,03	0,09	0,10	0,30	0,11	0,33	0,02	0,05	0,04	0,11	0,04	0,12	0,03	0,09
26	0,03	0,09	0,09	0,21	0,12	0,36	0,00	0,00	0,02	0,06	0,02	0,06	0,00	0,00
27	0,00	0,00	0,09	0,27	0,10	0,30	0,00	0,00	0,02	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00
28	0,00	0,00	0,08	0,24	0,10	0,30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
29	0,00	0,00	0,06	0,18	0,07	0,20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
30	0,00	0,00	0,05	0,15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	1,00	3,02	3,46	10,43	2,97	8,96	2,26	6,81	1,83	5,53	1,43	4,32	1,15	3,46

Tab. 10: C-Peptidwerte (pMol/ml u. ng/ml) im Tolbutamidtest (1 g Tolbutamid i.v.) bei einem Patienten mit bioptisch gesicherter Leberzellverfettung und einem latenten Diabetes mellitus nach säulenchromatographischer Abtrennung des Proinsulins (Sephadex G 50 superfine).

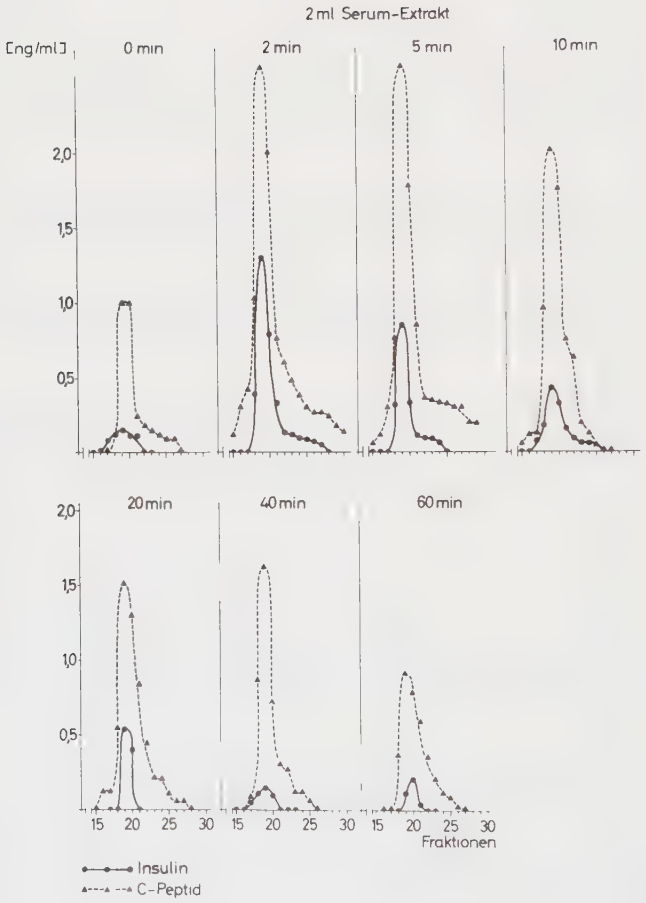

Abb. 28: Insulin- (IRI) und C-Peptidelutionsdiagramme (IRCP) nach säulenchromatographischer Abtrennung des Proinsulins (Sephadex G 50 superfine) im Tolbutamidtest bei einem Patienten mit latentem Diabetes mellitus und einer bioptisch gesicherten Leberzellverfettung

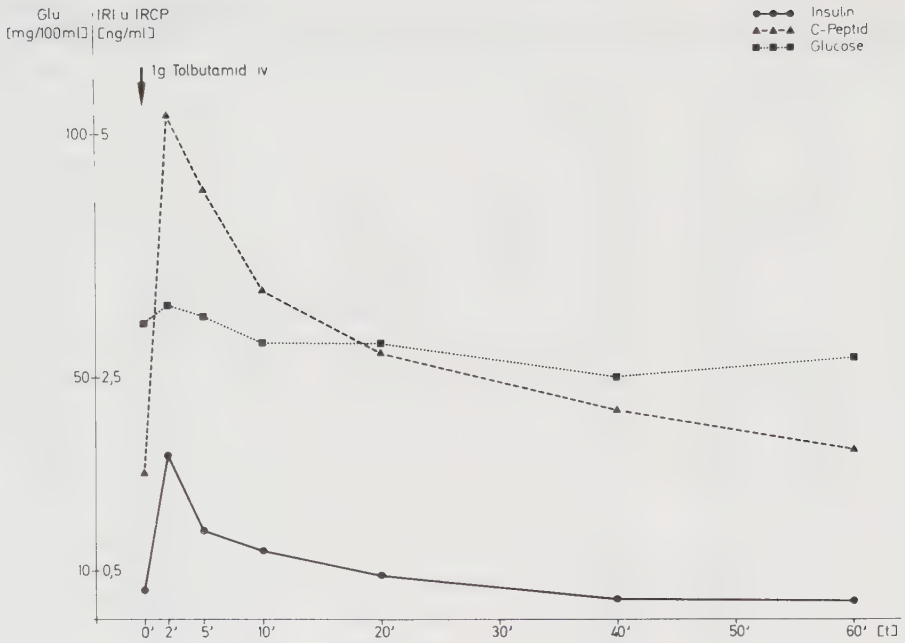

Abb. 29: Glucose (Glu), Insulin (IRI) und C-Peptid (IRCP) nach Applikation von 1 g Tolbutamid iv. bei einem Patienten mit latentem Diabetes mellitus und einer bioptisch gesicherten Leberzellverfettung

Frakt.	0'		2'		5'		10'		20'		40'		60'	
Nr.	µE/ml	ng/ml	µE/ml	ng/ml	µE/ml	ng/ml	µE/ml	ng/ml	µE/ml	ng/ml	µE/ml	ng/ml	µE/ml	ng/ml
15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,51	0,07
16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,20	0,10
17	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,74	0,08	3,49	0,16
18	2,88	0,13	0,00	0,00	0,00	0,00	4,94	0,22	9,79	0,45	2,20	0,10	10,90	0,50
19	23,37	1,10	8,21	0,37	8,72	0,40	28,60	1,30	28,28	1,29	4,76	0,22	7,85	0,36
20	13,20	0,60	49,17	2,24	21,99	1,00	24,81	1,13	14,77	0,67	12,56	0,57	6,21	0,28
21	3,25	0,15	21,85	0,99	23,09	1,05	15,40	0,70	9,56	0,43	10,36	0,47	5,93	0,27
22	0,00	0,00	14,21	0,65	19,27	0,87	7,07	0,32	6,11	0,28	5,55	0,25	3,60	0,16
23	0,00	0,00	6,88	0,31	14,35	0,65	6,98	0,32	6,00	0,27	5,05	0,23	2,64	0,12
24	0,00	0,00	2,57	0,12	7,61	0,34	4,91	0,22	4,39	0,20	3,38	0,15	0,00	0,00
25	0,00	0,00	1,95	0,09	0,00	0,00	2,08	0,09	3,79	0,17	2,23	0,10	0,00	0,00
26	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,70	0,17	2,04	0,09	0,00	0,00
27	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,07	0,09	1,86	0,09	0,00	0,00
28	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,56	0,07	0,00	0,00
29	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,37	0,06	0,00	0,00
	42,70	1,98	104,84	4,77	95,03	4,32	94,79	4,30	88,46	4,02	54,66	2,48	44,33	2,02

Tab. 11: Insulinwerte (µE/ml u. ng/ml) im Tolbutamidtest (1 g Tolbutamid i.v.) bei einem Patienten mit manifestem Diabetes mellitus nach säulenchromatographischer Abtrennung des Proinsulins (Sephadex G 50 superfine).

Frakt.	0'		2'		5'		10'		20'		40'		60'	
Nr.	pM/ml	ng/ml	pM/ml	ng/ml	pM/ml	ng/ml	pM/ml	ng/ml	pM/ml	ng/ml	pM/ml	ng/ml	pM/ml	ng/ml
15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,03
16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,05
17	0,06	0,18	0,01	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06	0,17
18	0,13	0,39	0,01	0,03	0,00	0,00	0,16	0,48	0,20	0,60	0,00	0,00	1,30	3,93
19	1,40	4,23	0,32	0,97	0,26	0,79	0,74	2,20	0,86	2,60	0,30	0,91	0,49	1,48
20	0,94	2,84	2,00	6,04	0,92	2,78	0,80	2,40	0,43	1,30	1,00	3,02	0,45	1,36
21	0,30	0,91	0,74	2,24	0,78	2,36	0,53	1,60	0,35	1,06	0,60	1,81	0,22	0,66
22	0,10	0,30	0,52	1,57	0,46	1,39	0,33	1,00	0,32	0,97	0,42	1,27	0,15	0,45
23	0,07	0,21	0,29	0,88	0,38	1,15	0,24	0,73	0,24	0,73	0,28	0,85	0,07	0,21
24	0,06	0,18	0,14	0,42	0,22	0,66	0,18	0,54	0,20	0,60	0,16	0,48	0,06	0,18
25	0,06	0,18	0,08	0,24	0,09	0,27	0,10	0,30	0,11	0,33	0,08	0,24	0,05	0,15
26	0,05	0,15	0,03	0,07	0,08	0,23	0,06	0,17	0,06	0,17	0,06	0,18	0,05	0,15
27	0,05	0,15	0,02	0,06	0,06	0,18	0,03	0,09	0,03	0,09	0,03	0,09	0,02	0,06
28	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,07	0,02	0,06	0,02	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00
29	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	3,22	10,00	4,15	12,54	3,31	10,00	3,19	9,87	2,82	8,51	2,93	8,85	2,94	8,88

Tab. 12: C-Peptidwerte (pMol/ml u. ng/ml) im Tolbutamidtest (1 g Tolbutamid i.v.) bei einem Patienten mit manifestem Diabetes mellitus nach säulenchromatographischer Abtrennung des Proinsulins (Sephadex G 50 superfine).

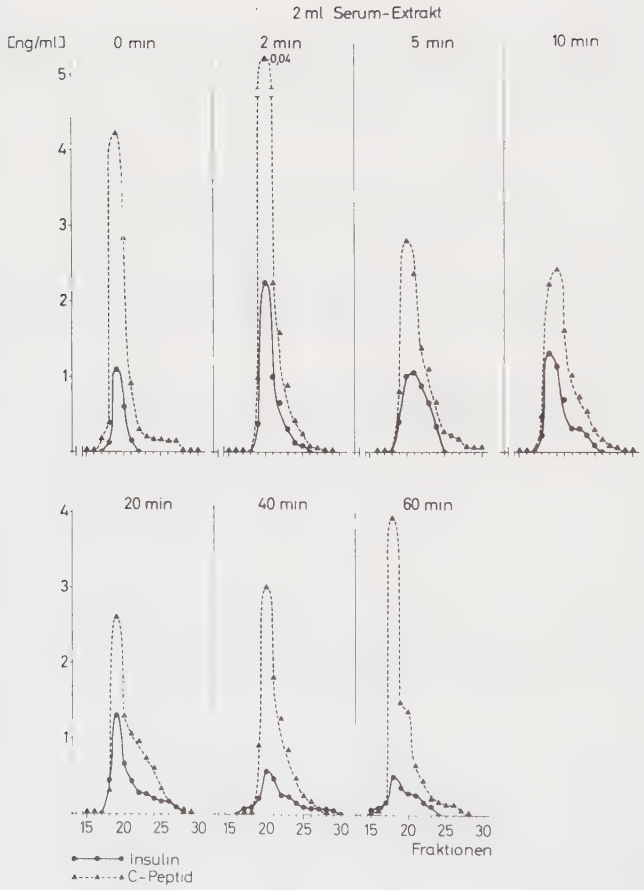

Abb. 30: Insulin- (IRI) und C-Peptidelutionsdiagramme (IRCP) nach säulenchromatographischer Abtrennung des Proinsulins (Sephadex G 50 superfine) im Tolbutamidtest bei einem Patienten mit manifestem Diabetes mellitus

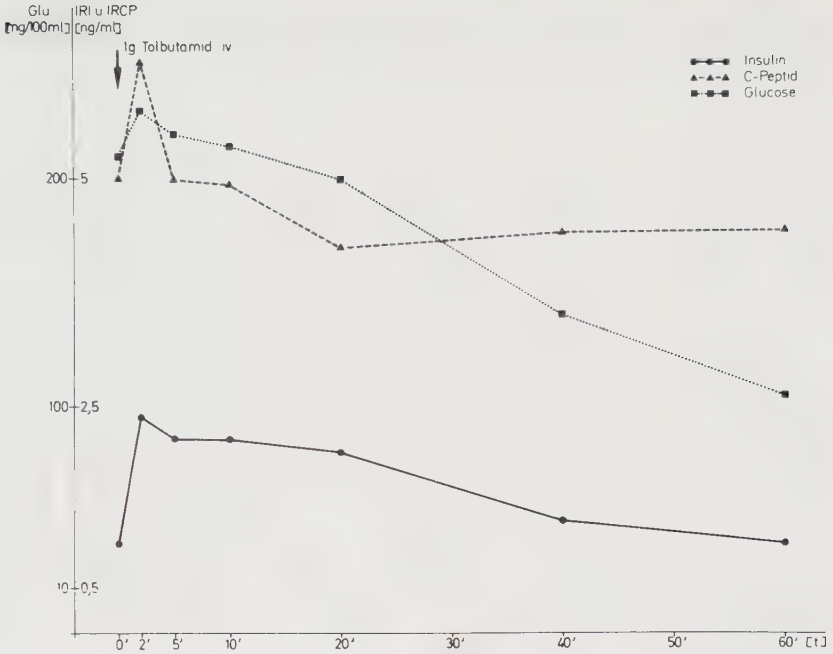

Abb. 31: Glucose (Glu), Insulin (IRI) und C-Peptid (IRCP) nach Applikation von 1 g Tolbutamid iv. bei einem Patienten mit manifestem Diabetes mellitus

3.3 Insulin- und C-Peptidwerte im intravenösen Glukose-Toleranz-Test

Die Abbildungen 32, 34 und 36 zeigen die Insulin- und C-Peptidelutionsdiagramme im intravenösen Glukosebelastungstest nach säulenchromatographischer Abtrennung des Proinsulins.

Der Test wurde bei den Patienten 1, 4 und 5 durchgeführt.

In den Abbildungen 33, 35 und 37 sind die aus der Summe der Einzelwerte (Tab. 13 - 18) errechneten Insulin- und C-Peptidserumspiegel als Funktion der Zeit aufgetragen.

Frakt.	0'		2'		5'		10'		15'		25'		35'		55'	
Nr.	µE/ml	ng/ml	µE/ml	ng/ml	µE/ml	ng/ml	µE/ml	ng/ml	µE/ml	ng/ml	µE/ml	ng/ml	µE/ml	ng/ml	µE/ml	ng/ml
17	0,00	0,00	0,00	0,00	7,19	0,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
18	0,00	0,00	0,00	0,00	10,43	0,47	5,97	0,27	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
19	0,00	0,00	0,00	0,00	11,02	0,50	7,27	0,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
20	0,00	0,00	0,00	0,00	15,09	0,68	7,17	0,32	1,61	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
21	0,00	0,00	5,40	0,25	6,45	0,29	6,20	0,28	2,78	0,13	2,59	0,12	0,00	0,00	0,00	0,00
22	0,00	0,00	6,39	0,29	0,00	0,00	0,00	0,00	5,40	0,25	3,39	0,15	0,00	0,00	0,00	0,00
23	0,71	0,03	7,49	0,34	0,00	0,00	0,00	0,00	6,84	0,31	5,20	0,24	0,81	0,04	0,00	0,00
24	2,93	0,13	10,29	0,47	0,00	0,00	0,00	0,00	9,91	0,45	5,93	0,27	3,26	0,15	2,49	0,11
25	1,61	0,07	11,01	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	4,56	0,21	7,87	0,36	6,53	0,30	4,86	0,22
26	0,42	0,02	13,34	0,61	0,00	0,00	0,00	0,00	2,99	0,14	8,79	0,40	6,37	0,29	6,47	0,29
27	0,00	0,00	8,74	0,40	0,00	0,00	0,00	0,00	1,56	0,07	5,02	0,23	3,42	0,16	5,13	0,23
28	0,00	0,00	8,21	0,37	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,87	0,22	0,78	0,04	3,14	0,14
29	0,00	0,00	6,84	0,31	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,16	0,10	0,00	0,00	1,02	0,05
30	0,00	0,00	4,93	0,22	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
31	0,00	0,00	2,61	0,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
32	0,00	0,00	0,93	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	5,67	0,25	86,18	3,92	50,18	2,27	26,61	1,20	35,65	1,63	45,82	2,09	21,17	0,97	23,11	1,04

Tab. 13: Insulinwerte (µE/ml u. ng/ml) im intravenösen Glucosebelastungstest (25 g Glucose i.v.) bei einem Patienten mit bioptisch gesicherter Leberzellverfettung nach säulenchromatographischer Abtrennung des Proinsulins (Sephadex G 50 superfine).

Frakt.	0'		2'		5'		10'		15'		25'		35'		55'	
Nr.	pM/ml	ng/ml	pM/ml	ng/ml	pM/ml	ng/ml	pM/ml	ng/ml	pM/ml	ng/ml	pM/ml	ng/ml	pM/ml	ng/ml	pM/ml	ng/ml
16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,03	0,01	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
17	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20	0,60	0,23	0,69	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
18	0,00	0,00	0,02	0,06	0,30	0,91	0,24	0,73	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
19	0,00	0,00	0,13	0,39	0,32	0,97	0,25	0,76	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
20	0,00	0,00	0,18	0,54	0,28	0,85	0,18	0,54	0,01	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
21	0,00	0,00	0,21	0,63	0,16	0,48	0,13	0,39	0,02	0,06	0,01	0,03	0,02	0,06	0,00	0,00
22	0,02	0,06	0,23	0,69	0,10	0,30	0,08	0,25	0,05	0,15	0,02	0,06	0,03	0,09	0,04	0,12
23	0,10	0,30	0,24	0,73	0,05	0,15	0,04	0,12	0,12	0,36	0,09	0,27	0,06	0,18	0,08	0,24
24	0,12	0,36	0,18	0,54	0,03	0,09	0,03	0,09	0,28	0,85	0,22	0,66	0,16	0,48	0,16	0,48
25	0,08	0,24	0,13	0,39	0,01	0,03	0,00	0,00	0,29	0,88	0,32	0,97	0,34	1,03	0,34	1,03
26	0,06	0,18	0,10	0,30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,24	0,73	0,26	0,79	0,18	0,54	0,28	0,84
27	0,03	0,09	0,08	0,24	0,00	0,00	0,00	0,00	0,16	0,48	0,12	0,36	0,08	0,24	0,16	0,48
28	0,02	0,06	0,06	0,18	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,30	0,08	0,24	0,06	0,18	0,08	0,24
29	0,01	0,03	0,03	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00	0,08	0,24	0,04	0,12	0,02	0,06	0,04	0,12
30	0,00	0,00	0,02	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	0,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	0,44	1,32	1,61	4,84	1,46	4,40	1,19	3,60	1,39	4,20	1,16	3,50	0,95	2,86	1,18	3,55

Tab. 14: C-Peptidwerte (pMol/ml u. ng/ml) im intravenösen Glucosebelastungstest (25 g Glucose i.v.) bei einem Patienten mit biotisch gesicherter Leberzellverfettung nach säulenchromatographischer Abtrennung des Proinsulins (Sephadex G 50 superfine).

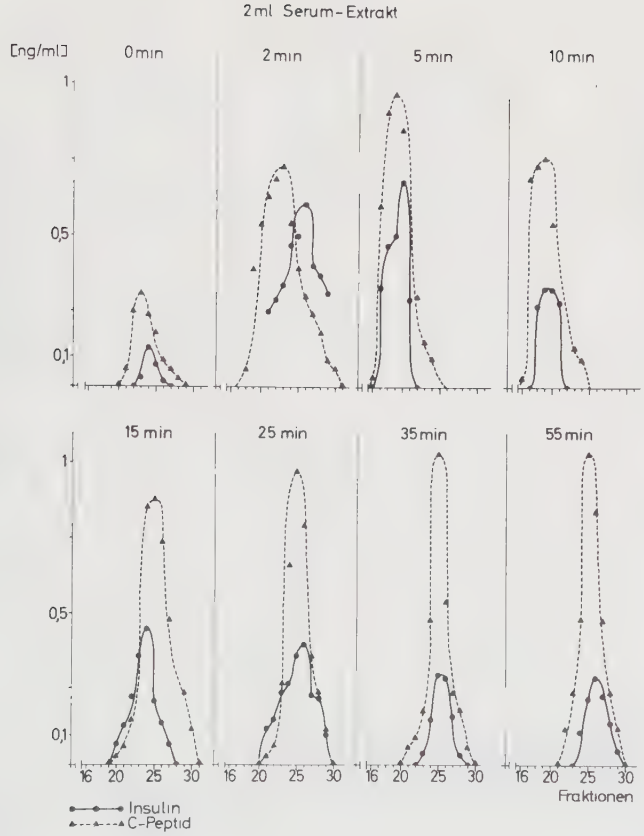

Abb. 32: Insulin- (IRI) und C-Peptidelutionsdiagramme (IRCP) nach säulenchromatographischer Abtrennung des Proinsulins (Sephadex G 50 superfine) im intravenösen Glucosebelastungstest bei einem Patienten mit bioptisch gesicherter Leberzellverfettung

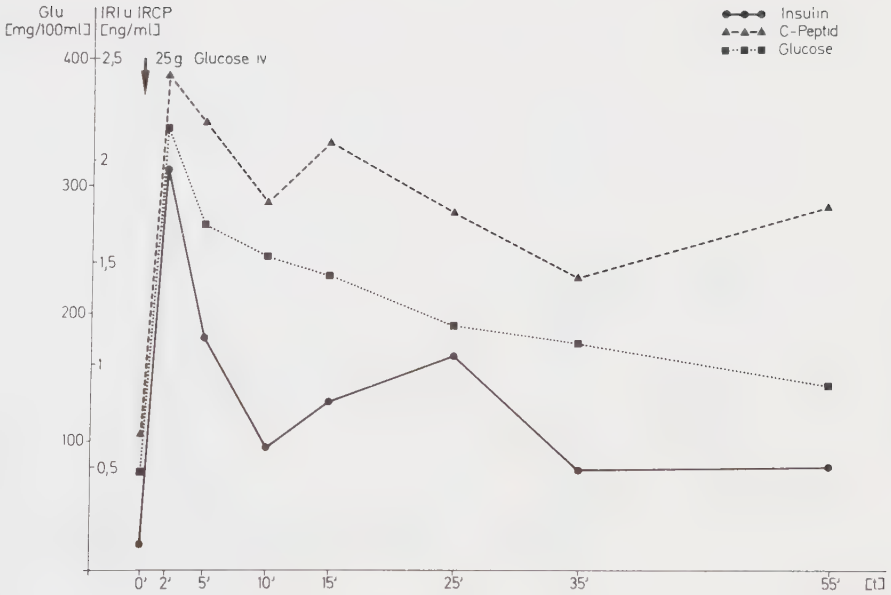

Abb. 33: Glucose (Glu), Insulin (IRI) und C-Peptid (IRCP) nach Applikation von 25 g Glucose iv. bei einem Patienten mit bioptisch gesicherter Leberzellverfettung

Frakt.	0'		2'		5'		10'		15'		25'		35'		55'	
Nr.	µE/ml	ng/ml	µE/ml	ng/ml	µE/ml	ng/ml	µE/ml	ng/ml	µE/ml	ng/ml	µE/ml	ng/ml	µE/ml	ng/ml	µE/ml	ng/ml
16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,08	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
17	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,98	0,14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
18	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	9,42	0,43	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
19	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	12,87	0,59	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	13,67	0,62	0,00	0,00	0,00	0,00	5,99	0,27	0,00	0,00
21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	6,00	0,27	2,16	0,10	0,00	0,00	6,53	0,30	0,00	0,00
22	1,61	0,07	3,04	0,14	1,76	0,08	2,18	0,10	2,52	0,11	5,17	0,24	3,31	0,15	1,13	0,05
23	2,16	0,10	6,07	0,28	2,43	0,11	1,59	0,07	4,01	0,18	9,91	0,45	0,00	0,00	2,81	0,13
24	2,68	0,12	10,61	0,48	5,69	0,26	0,00	0,00	5,57	0,25	10,03	0,46	0,00	0,00	5,98	0,27
25	3,76	0,17	24,79	1,13	11,10	0,50	0,00	0,00	9,73	0,44	5,78	0,26	0,00	0,00	2,53	0,12
26	2,01	0.09	19,51	0,89	14,14	0,64	0,00	0,00	9,17	0,42	2,65	0,12	0,00	0,00	1,04	0,05
27	0,00	0,00	8,67	0,39	10,39	0,47	0,00	0,00	7,16	0,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
28	0,00	0,00	5,04	0,23	7,01	0,32	0,00	0,00	4,45	0,20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
29	0,00	0,00	2,94	0,13	3,40	0,15	0,00	0,00	2,65	0,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
30	0,00	0,00	0,00	0,00	1,44	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	12,22	0,55	80,67	3,67	57,36	2,60	49,79	2,27	47,42	2,15	33,54	1,53	15,83	0,72	13,42	0,62

Tab. 15: Insulinwerte (µE/ml u. ng/ml) im intravenösen Glucosebelastungstest (25 g Glucose i.v.) bei einem Patienten mit bioptisch gesicherter Leberzellverfettung und einem latenten Diabetes mellitus nach säulenchromatographischer Abtrennung des Proinsulins (Sephadex G 50 superfine).

Frakt.	0'		2'		5'		10'		15'		25'		35'		55'	
Nr.	pM/ml	ng/ml	pM/ml	ng/ml	pM/ml	ng/ml	pM/ml	ng/ml	pM/ml	ng/ml	pM/ml	ng/ml	pM/ml	ng/ml	pM/ml	ng/ml
17	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,11	0,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,05	0,00	0,00
18	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,37	1,12	0,00	0,00	0,02	0,06	0,04	0,12	0,00	0,00
19	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,53	1,60	0,00	0,00	0,03	0,09	0,13	0,39	0,00	0,00
20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,39	1,18	0,00	0,00	0,05	0,15	0,41	1,24	0,02	0,06
21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,20	0,60	0,01	0,03	0,10	0,30	0,50	1,51	0,04	0,12
22	0,00	0,00	0,05	0,15	0,06	0,18	0,10	0,30	0,03	0,09	0,29	0,88	0,28	0,85	0,18	0,54
23	0,06	0,18	0,20	0,60	0,15	0,45	0,08	0,24	0,13	0,39	0,55	1,66	0,20	0,60	0,36	1,09
24	0,12	0,36	0,45	1,36	0,34	1,03	0,05	0,15	0,31	0,94	0,54	1,63	0,10	0,30	0,44	1,33
25	0,14	0,42	0,64	1,93	0,51	1,54	0,04	0,12	0,44	1,33	0,36	1,09	0,05	0,15	0,30	0,91
26	0,14	0,42	0,50	1,51	0,40	1,21	0,04	0,12	0,48	1,45	0,19	0,57	0,04	0,12	0,24	0,72
27	0,07	0,21	0,32	0,97	0,29	0,88	0,00	0,00	0,24	0,73	0,09	0,27	0,04	0,12	0,16	0,48
28	0,06	0,17	0,23	0,69	0,15	0,45	0,00	0,00	0,14	0,42	0,08	0,24	0,03	0,09	0,12	0,36
29	0,03	0,08	0,17	0,51	0,14	0,42	0,00	0,00	0,07	0,21	0,06	0,18	0,01	0,03	0,08	0,24
30	0,03	0,08	0,09	0,27	0,09	0,27	0,00	0,00	0,04	0,12	0,04	0,12	0,01	0,03	0,04	0,12
31	0,02	0,06	0,08	0,24	0,05	0,15	0,00	0,00	0,04	0,12	0,03	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00
32	0,00	0,00	0,07	0,21	0,04	0,12	0,00	0,00	0,04	0,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	6,55	1,97	2,80	8,44	2,22	6,70	1,91	5,76	1,99	6,02	2,43	7,33	1,86	5,60	1,98	5,97

Tab. 16: C-Peptidwerte (pMol/ml u. ng/ml) im intravenösen Glucosebelastungstest (25 g Glucose i.v.) bei einem Patienten mit bioptisch gesicherter Leberzellverfettung und einem latenten Diabetes mellitus nach säulenchromatographischer Abtrennung des Proinsulins (Sephadex G 50 superfine).

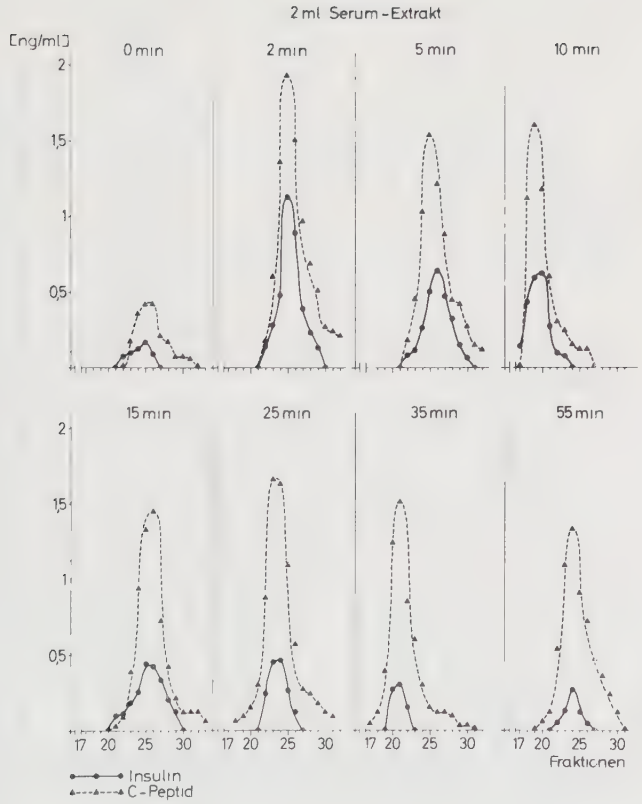

Abb. 34: Insulin- (IRI) und C-Peptidelutionsdiagramme (IRCP) nach säulenchromatographischer Abtrennung des Proinsulins (Sephadex G 50 superfine) im intravenösen Glucosebelastungstest bei einem Patienten mit bioptisch gesicherter Leberzellverfettung und einem latenten Diabetes mellitus

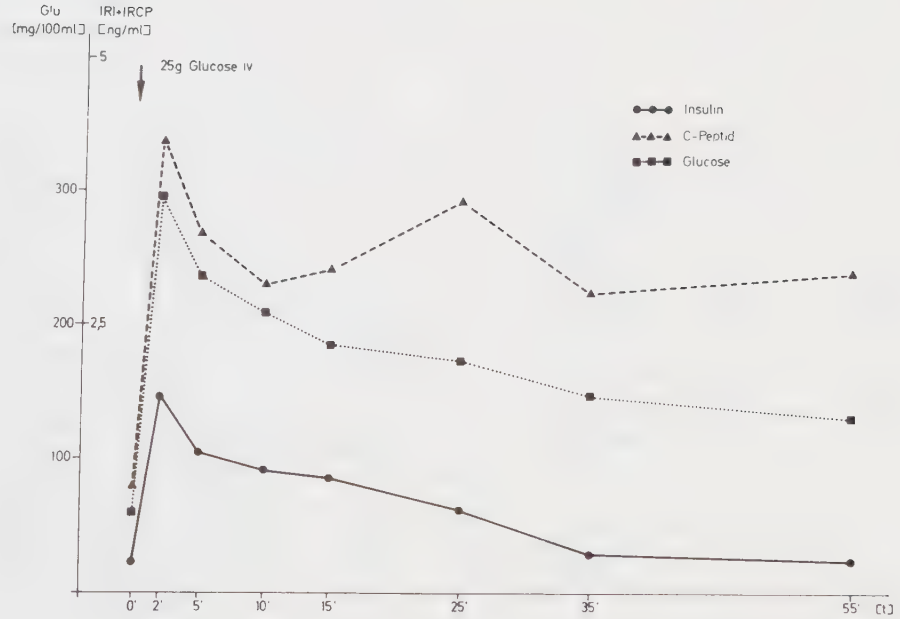

Abb. 35: Glucose (Glu), Insulin (IRI) und C-Peptid (IRCP) nach Applikation von 25 g Glucose iv. bei einem Patienten mit bioptisch gesicherter Leberzellverfettung und einem latenten Diabetes mellitus

Frakt.	0'		2'		5'		10'		15'		25'		35'		55'	
Nr.	µE/ml	ng/ml	µE/ml	ng/ml	µE/ml	ng/ml	µE/ml	ng/ml	µE/ml	ng/ml	µE/ml	ng/ml	µE/ml	ng/ml	µE/ml	ng/ml
17	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
18	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,55	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
19	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,12	0,05	0,00	0,00	2,22	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00
20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,44	0,16	2,09	0,10	2,58	0,12	0,00	0,00	1,50	0,07
21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	8,95	0,41	2,83	0,13	3,16	0,14	0,00	0,00	2,43	0,11
22	0,70	0,03	0,00	0,00	0,31	0,01	11,06	0,50	4,55	0,21	6,53	0,30	2,10	0,10	3,14	0,14
23	0,70	0,03	0,58	0,03	0,38	0,02	4,53	0,21	4,93	0,22	7,56	0,34	2,42	0,11	2,09	0,10
24	2,53	0,12	1,68	0,08	0,43	0,02	1,63	0,07	6,58	0,30	3,65	0,17	2,97	0,14	1,21	0,06
25	3,24	0,15	2,96	0,13	1,82	0,08	0,29	0,01	8,85	0,40	0,00	0,00	4,83	0,22	0,00	0,00
26	5,55	0,25	3,17	0,14	3,00	0,14	0,00	0,00	6,79	0,31	0,00	0,00	5,98	0,27	0,00	0,00
27	4,68	0,21	4,24	0,19	3,77	0,17	0,00	0,00	6,04	0,27	0,00	0,00	5,07	0,23	0,00	0,00
28	3,34	0,15	2,43	0,11	1,87	0,09	0,00	0,00	3,55	0,16	0,00	0,00	2,80	0,13	0,00	0,00
29	1,03	0,05	1,45	0,07	0,29	0,01	0,00	0,00	3,11	0,14	0,00	0,00	2,64	0,12	0,00	0,00
30	0,38	0,02	1,12	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	2,75	0,13	0,00	0,00	2,29	0,10	0,00	0,00
31	0,00	0,00	1,05	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	2,27	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
32	0,00	0,00	0,92	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	22,15	1,01	19,60	0,88	11,87	0,54	31,57	1,30	54,34	2,47	25,70	1,17	31,10	1,42	10,37	0,47

Tab. 17: Insulinwerte (µE/ml u. ng/ml) im intravenösen Glucosebelastungstest (25 g Glucose i.v.) bei einem Patienten mit manifestem Diabetes mellitus nach säulenchromatographischer Abtrennung des Proinsulins (Sephadex G 50 superfine).

Frakt.	0'		2'		5'		10'		15'		25'		35'		55'	
Nr.	pM/ml	ng/ml	pM/ml	ng/ml	pM/ml	ng/ml	pM/ml	ng/ml	pM/ml	ng/ml	pM/ml	ng/ml	pM/ml	ng/ml	pM/ml	ng/ml
16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
17	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,06
18	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,08	0,24	0,00	0,00	0,01	0,03	0,00	0,00	0,02	0,06
19	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,22	0,66	0,03	0,08	0,11	0,33	0,00	0,00	0,08	0,24
20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,57	1,72	0,04	0,12	0,30	0,91	0,00	0,00	0,18	0,54
21	0,02	0,06	0,00	0,00	0,03	0,09	1,02	3,08	0,10	0,30	0,52	1,57	0,03	0,09	0,50	1,51
22	0,04	0,12	0,06	0,18	0,05	0,15	0,96	2,90	0,24	0,73	0,61	1,84	0,08	0,24	0,60	1,81
23	0,08	0,24	0,09	0,27	0,13	0,39	0,40	1,21	0,50	1,51	0,60	1,80	0,16	0,48	0,46	1,39
24	0,25	0,76	0,18	0,54	0,29	0,88	0,21	0,63	0,60	1,80	0,30	0,91	0,37	1,12	0,30	0,91
25	0,50	1,50	0,31	0,94	0,41	1,24	0,19	0,57	0,38	1,15	0,14	0,42	0,55	1,66	0,21	0,63
26	0,48	1,45	0,44	1,33	0,57	1,72	0,14	0,42	0,36	1,09	0,08	0,24	0,64	1,93	0,17	0,51
27	0,36	1,09	0,40	1,21	0,41	1,24	0,06	0,36	0,21	0,63	0,05	0,15	0,49	1,48	0,13	0,39
28	0,23	0,69	0,35	1,06	0,29	0,88	0,06	0,36	0,17	0,51	0,04	0,12	0,33	1,00	0,10	0,30
29	0,14	0,42	0,23	0,69	0,18	0,54	0,06	0,36	0,09	0,27	0,04	0,11	0,27	0,82	0,03	0,09
30	0,11	0,33	0,21	0,63	0,14	0,42	0,03	0,09	0,04	0,12	0,04	0,11	0,17	0,50	0,02	0,06
31	0,08	0,24	0,14	0,42	0,12	0,36	0,00	0,00	0,04	0,11	0,04	0,11	0,13	0,38	0,02	0,06
32	0,08	0,24	0,12	0,36	0,09	0,27	0,00	0,00	0,03	0,08	0,00	0,00	0,08	0,24	0,01	0,03
33	0,03	0,09	0,08	0,24	0,07	0,20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	2,40	7,23	2,61	7,87	2,78	8,38	4,04	12,72	2,82	8,49	2,87	8,65	3,29	9,94	2,85	8,59

Tab. 18: C-Peptidwerte (pMol/ml u. ng/ml) im intravenösen Glucosebelastungstest (25 g Glucose i.v.) bei einem Patienten mit manifestem Diabetes mellitus nach säulenchromatographischer Abtrennung des Proinsulins (Sephadex G 50 superfine).

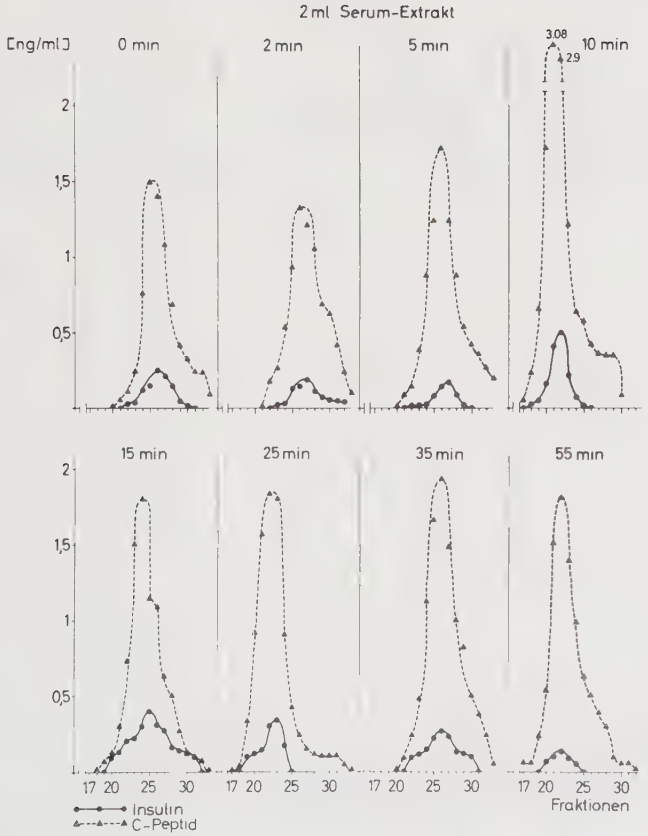

Abb. 36: Insulin- (IRI) und C-Peptidelutionsdiagramme (IRCP) nach säulenchromatographischer Abtrennung des Proinsulins (Sephadex G 50 superfine) im intravenösen Glucosebelastungstest bei einem Patienten mit manifestem Diabetes mellitus

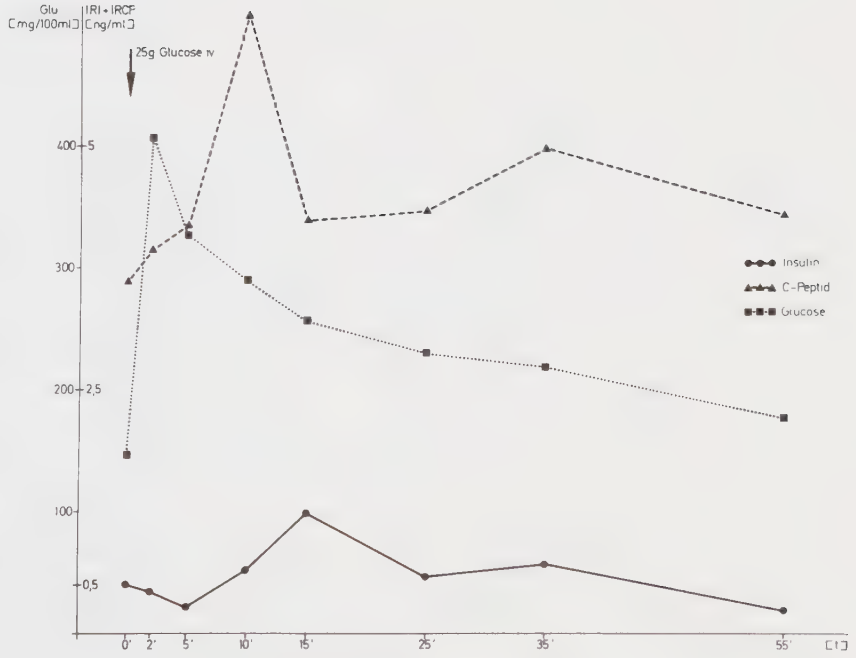

Abb. 37: Glucose (Glu), Insulin (IRI) und C-Peptid (IRCP) nach Applikation von 25 g Glucose iv. bei einem Patienten mit manifestem Diabetes mellitus

3.4 Insulin- und C-Peptidwerte im oralen Glukose-Toleranz-Test

Die Abbildungen 38, 40, 42, 44 und 46 zeigen die Insulin- und C-Peptidelutionsdiagramme im oralen Glukosebelastungstest nach säulenchromatographischer Abtrennung des Proinsulins.

Der Test wurde bei allen fünf Patienten durchgeführt.

In den Abbildungen 39, 41, 43, 45 und 47 sind die aus der Summe der Einzelwerte (Tab. 19 - 28) errechneten Insulin- und C-Peptidserumspiegel als Funktion der Zeit aufgetragen.

Frakt.	0'		30'		60'		120'		180'	
Nr.	µE/ml	ng/ml	µE/ml	ng/ml	µE/ml	ng/ml	µE/ml	ng/ml	µE/ml	ng/ml
17	4,62	0,21	0,00	0,00	0,00	0,00	1,69	0,08	0,00	0,00
18	3,64	0,17	0,00	0,00	0,00	0,00	2,46	0,11	0,00	0,00
19	2,80	0,13	14,48	0,66	10,68	0,49	3,23	0,15	0,00	0,00
20	0,00	0,00	21,05	0,96	26,75	1,22	3,61	0,16	0,00	0,00
21	0,00	0,00	9,84	0,45	20,36	0,93	10,29	0,47	3,27	0,15
22	0,00	0,00	3,95	0,18	9,54	0,43	10,66	0,48	15,31	0,70
23	0,00	0,00	0,00	0,00	3,97	0,18	6,06	0,28	10,31	0,47
24	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,14	0,23	7,94	0,36
25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,36	0,11	0,00	0,00
	11,06	0,51	49,32	2,25	71,30	3,25	45,50	2,06	36,83	1,68

Tab. 19: Insulinwerte (µE/ml u. ng/ml) im oralen Glucosebelastungstest (100 g Glucose oral) bei einem Patienten mit bioptisch gesicherter Leberzellverfettung nach säulenchromatographischer Abtrennung des Proinsulins (Sephadex G 50 superfine).

Frakt.	0'		30'		60'		120'		180'	
Nr.	pM/ml	ng/ml	pM/ml	ng/ml	pM/ml	ng/ml	pM/ml	ng/ml	pM/ml	ng/ml
17	0,34	1,03	0,02	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
18	1,40	4,23	0,04	0,12	0,02	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00
19	0,10	0,30	2,00	6,04	0,45	1,36	0,00	0,00	0,00	0,00
20	0,04	0,12	2,00	6,04	2,00	6,04	0,12	0,36	0,02	0,06
21	0,02	0,06	2,00	6,04	2,00	6,04	1,40	4,23	0,28	0,83
22	0,02	0,06	0,22	0,66	0,49	1,48	2,00	6,04	0,56	1,69
23	0,00	0,00	0,06	0,19	0,17	0,51	1,40	4,23	0,58	1,75
24	0,00	0,00	0,02	0,06	0,06	0,18	0,25	0,76	0,38	1,15
25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,09	0,27	0,23	0,69
26	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,06	0,10	0,30
27	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	0,12
	1,92	5,80	6,36	19,21	5,19	15,66	5,28	15,95	2,21	6,59

Tab. 20: C-Peptidwerte (pMol/ml u. ng/ml) im oralen Glucosebelastungstest (100 g Glucose oral) bei einem Patienten mit bioptisch gesicherter Leberzellverfettung nach säulenchromatographischer Abtrennung des Proinsulins (Sephadex G 50 superfine).

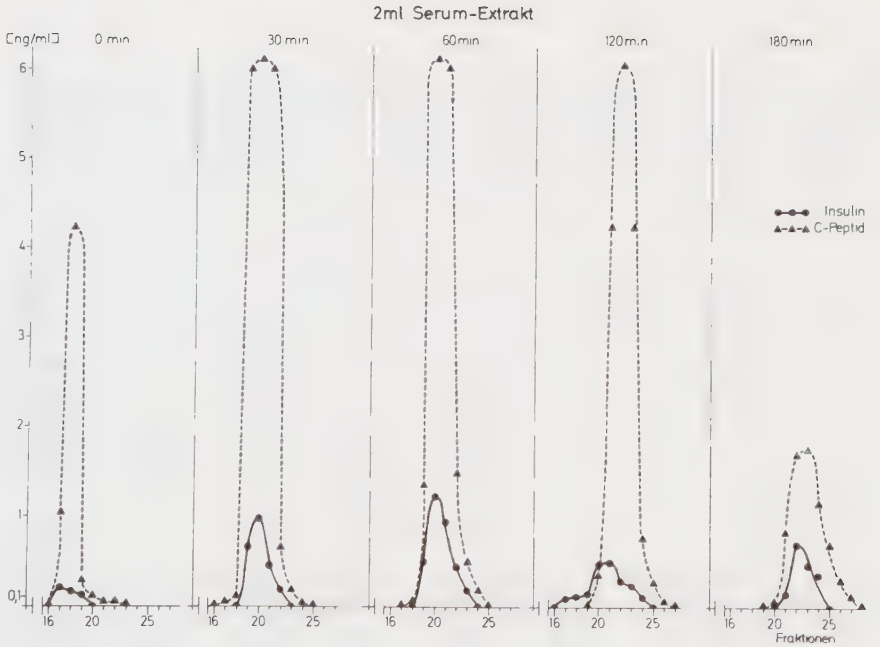

Abb. 38: Insulin- (IRI) und C-Peptidelutionsdiagramme (IRCP) nach säulenchromatographischer Abtrennung des Proinsulins (Sephadex G 50 superfine) im oralen Glucosebelastungstest bei einem Patienten mit bioptisch gesicherter Leberzellverfettung

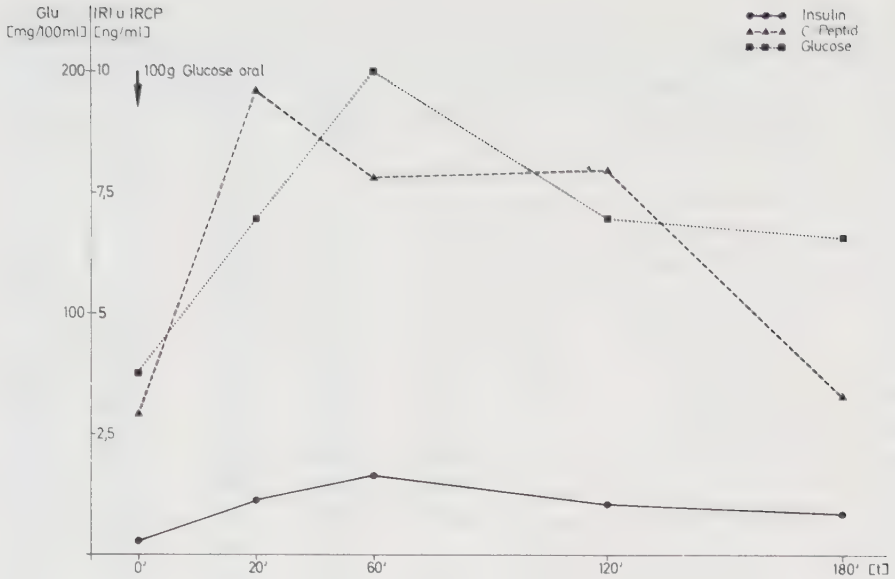

Abb. 39: Glucose (Glu), Insulin (IRI) und C-Peptid (IRCP) nach Applikation von 100 g Glucose oral bei einem Patienten mit bioptisch gesicherter Leberzellverfettung

Frakt.	0'		30'		60'		120'		180'	
Nr.	µE/ml	ng/ml	µE/ml	ng/ml	µE/ml	ng/ml	µE/ml	ng/ml	µE/ml	ng/ml
16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,95	0,18	0,00	0,00
17	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	11,08	0,50	3,70	0,17
18	0,00	0,00	36,17	1,64	0,00	0,00	13,37	0,61	3,88	0,18
19	0,00	0,00	21,07	0,96	0,00	0,00	14,30	0,65	4,16	0,19
20	0,00	0,00	17,48	0,79	0,00	0,00	24,57	1,12	8,41	0,38
21	6,74	0,31	9,95	0,45	26,46	1,20	18,02	0,82	9,60	0,44
22	0,00	0,00	0,00	0,00	37,44	1,70	9,98	0,45	9,99	0,45
23	0,00	0,00	0,00	0,00	42,74	1,94	4,83	0,22	10,06	0,46
24	0,00	0,00	0,00	0,00	34,82	1,58	2,94	0,13	7,12	0,32
25	0,00	0,00	0,00	0,00	13,24	0,60	2,05	0,09	2,45	0,11
26	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,69	0,08	1,69	0,08
	6,74	0,31	84,67	3,84	154,70	7,02	106,78	4,85	61,06	2,78

Tab. 21: Insulinwerte (µE/ml u. ng/ml) im oralen Glucosebelastungstest (100 g Glucose oral) bei einem Patienten mit latentem Diabetes mellitus und einer Leberfibrose nach säulenchromatographischer Abtrennung des Proinsulins (Sephadex G 50 superfine).

Frakt.	0'		30'		60'		120'		180'	
Nr.	pM/ml	ng/ml	pM/ml	ng/ml	pM/ml	ng/ml	pM/ml	ng/ml	pM/ml	ng/ml
17	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,08	0,00	0,00
18	0,00	0,00	0,04	0,12	0,00	0,00	0,04	0,12	0,00	0,00
19	0,00	0,00	0,68	2,05	0,00	0,00	0,42	1,27	0,00	0,00
20	0,00	0,00	0,37	1,12	0,03	0,09	1,40	4,23	0,15	0,45
21	0,05	0,15	0,35	1,06	0,40	1,21	0,60	1,81	0,40	1,21
22	0,22	0,66	0,17	0,51	0,57	1,72	0,35	1,06	0,44	1,33
23	0,06	0,19	0,10	0,30	0,56	1,69	0,16	0,48	0,40	1,21
24	0,03	0,09	0,03	0,08	0,43	1,30	0,08	0,25	0,26	0,79
25	0,01	0,03	0,01	0,03	0,31	0,94	0,07	0,21	0,10	0,30
26	0,00	0,00	0,00	0,00	0,15	0,45	0,04	0,12	0,05	0,15
27	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06	0,18	0,03	0,09	0,01	0,03
28	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	0,12	0,00	0,00	0,00	0,00
	0,37	1,12	1,75	5,27	2,55	7,70	3,22	9,72	1,81	5,47

Tab. 22: C-Peptidwerte (pMol/ml u. ng/ml) im oralen Glucosebelastungstest (100 g Glucose oral) bei einem Patienten mit latentem Diabetes mellitus und einer Leberfibrose nach säulenchromatographischer Abtrennung des Proinsulins (Sephadex G 50 superfine).

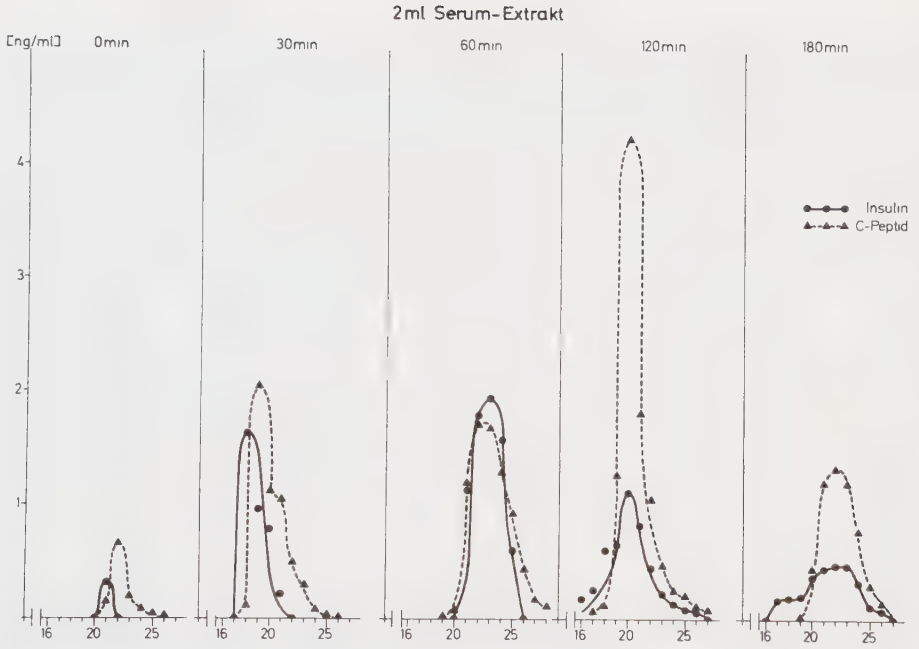

Abb. 40: Insulin- (IRI) und C-Peptidelutionsdiagramme (IRCP) nach säulenchromatographischer Abtrennung des Proinsulins (Sephadex G 50 superfine) im oralen Glucosebelastungstest bei einem Patienten mit latentem Diabetes mellitus und einer Leberfibrose

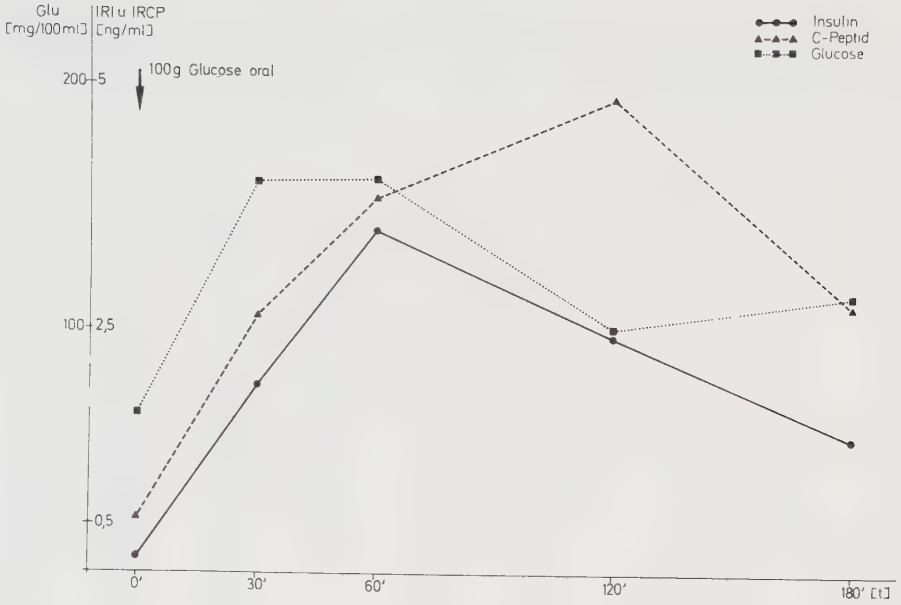

Abb. 41: Glucose (Glu), Insulin (IRI) und C-Peptid (IRCP) nach Applikation von 100 g Glucose oral bei einem Patienten mit latentem Diabetes mellitus und einer Leberfibrose

Frakt.	0'		30'		60'		120'		180'	
Nr.	µE/ml	ng/ml	µE/ml	ng/ml	µE/ml	ng/ml	µE/ml	ng/ml	µE/ml	ng/ml
16	0,00	0,00	5,64	0,26	0,00	0,00	0,00	0,00	8,09	0,37
17	0,00	0,00	19,58	0,89	7,42	0,33	0,00	0,00	17,44	0,79
18	0,00	0,00	41,70	1,90	10,57	0,48	0,00	0,00	14,86	0,63
19	0,00	0,00	13,85	0,63	102,07	4,64	5,39	0,25	10,88	0,49
20	0,00	0,00	8,25	0,38	52,30	2,38	6,92	0,31	7,07	0,32
21	0,00	0,00	6,82	0,31	25,29	1,15	34,64	1,57	6,69	0,30
22	6,05	0,28	5,57	0,25	18,78	0,85	62,15	2,83	5,14	0,23
23	10,20	0,46	4,52	0,21	14,84	0,67	36,33	1,65	4,91	0,22
24	7,34	0,33	0,00	0,00	9,59	0,44	25,53	1,16	4,21	0,19
25	5,14	0,23	0,00	0,00	0,00	0,00	13,91	0,63	0,00	0,00
26	4,66	0,21	0,00	0,00	0,00	0,00	8,57	0,39	0,00	0,00
27	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	6,55	0,30	0,00	0,00
	33,39	1,51	105,93	4,83	240,86	10,94	199,99	9,09	78,29	3,54

Tab. 23: Insulinwerte (µE/ml u. ng/ml) im oralen Glucosebelastungstest (100 g Glucose oral) bei einem Patienten mit bioptisch gesicherter Leberzellverfettung und einer chronischen Alkohol-Hepatitis nach säulenchromatographischer Abtrennung des Proinsulins (Sephadex G 50 superfine).

Frakt.	0'		30'		60'		120'		180'	
Nr.	pM/ml	ng/ml	pM/ml	ng/ml	pM/ml	ng/ml	pM/ml	ng/ml	pM/ml	ng/ml
16	0,00	0,00	0,01	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,30
17	0,00	0,00	0,41	1,24	0,01	0,03	0,00	0,00	0,36	1,09
18	0,00	0,00	0,48	1,45	0,10	0,30	0,00	0,00	0,29	0,88
19	0,00	0,00	0,21	0,63	0,55	1,66	0,00	0,00	0,11	0,35
20	0,00	0,00	0,12	0,36	0,53	1,60	0,06	0,18	0,07	0,21
21	0,00	0,00	0,09	0,27	0,37	1,12	0,46	1,39	0,06	0,17
22	0,14	0,42	0,03	0,08	0,22	0,66	0,64	1,93	0,01	0,03
23	0,26	0,79	0,03	0,08	0,13	0,38	0,41	1,24	0,00	0,00
24	0,12	0,36	0,01	0,03	0,09	0,27	0,29	0,88	0,00	0,00
25	0,09	0,27	0,00	0,00	0,03	0,09	0,12	0,36	0,00	0,00
26	0,04	0,07	0,00	0,00	0,01	0,03	0,06	0,18	0,00	0,00
27	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,09	0,00	0,00
28	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,05	0,00	0,00
	0,63	1,91	1,38	4,16	2,04	6,14	2,09	6,29	1,00	3,03

Tab. 24: C-Peptidwerte (pMol/ml u. ng/ml) im oralen Glucosebelastungstest (100 g Glucose oral) bei einem Patienten mit bioptisch gesicherter Leberzellverfettung und einer chronischen Alkohol-Hepatitis nach säulenchromatographischer Abtrennung des Proinsulins (Sephadex G 50 superfine).

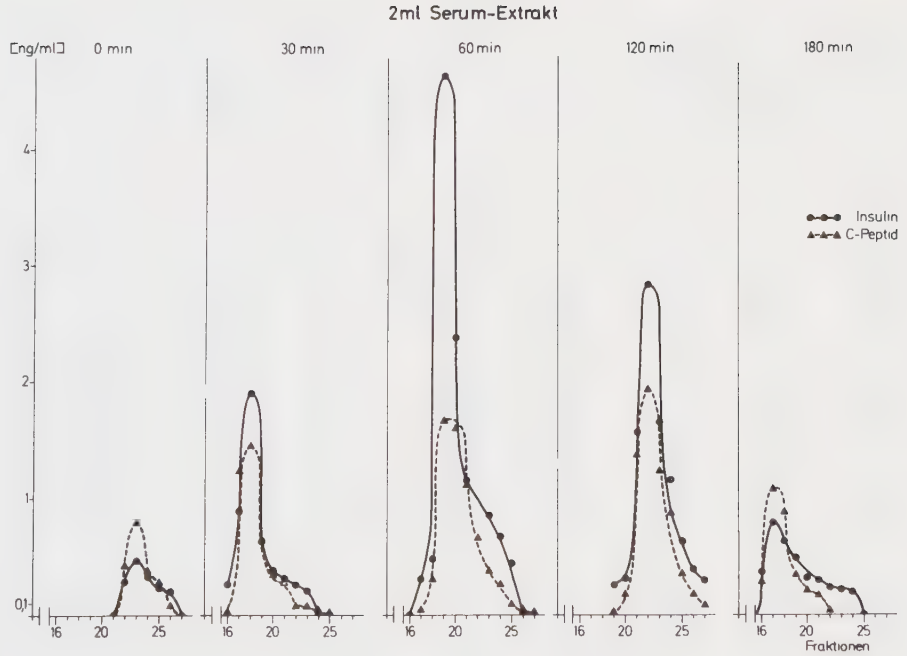

Abb. 42: Insulin- (IRI) und C-Peptidelutionsdiagramme (IRCP) nach säulenchromatographischer Abtrennung des Proinsulins (Sephadex G 50 superfine) bei einem Patienten mit bioptisch gesicherter Leberzellverfettung und einer chronischen Alkohol-Hepatitis

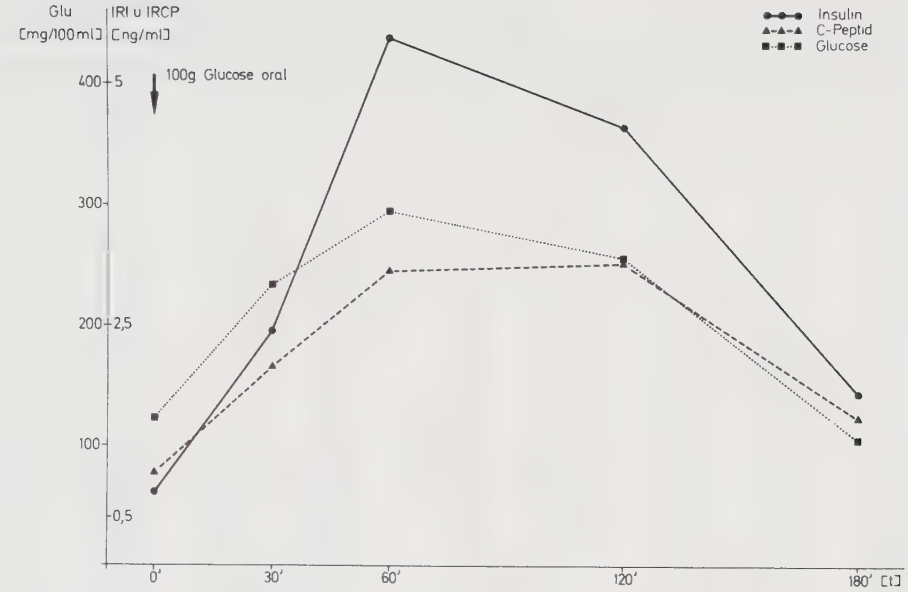

Abb. 43: Glucose (Glu), Insulin (IRI) und C-Peptid (IRCP) nach Applikation von 100 g Glucose oral bei einem Patienten mit bioptisch gesicherter Leberzellverfettung und einer chronischen Alkohol-Hepatitis

Frakt.	0'		30'		60'		120'		180'	
Nr.	µE/ml	ng/ml	µE/ml	ng/ml	µE/ml	ng/ml	µE/ml	ng/ml	µE/ml	ng/ml
17	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,97	0,23
18	3,88	0,18	2,95	0,13	0,00	0,00	0,00	0,00	30,91	1,41
19	3,52	0,16	18,21	0,83	6,28	0,29	0,00	0,00	27,72	1,26
20	0,00	0,00	26,30	1,20	40,82	1,86	0,00	0,00	3,38	0,15
21	0,00	0,00	12,17	0,55	64,26	2,92	10,01	0,46	0,00	0,00
22	0,00	0,00	5,56	0,25	39,77	1,81	57,29	2,60	0,00	0,00
23	0,00	0,00	0,00	0,00	19,58	0,89	80,47	3,66	0,00	0,00
24	0,00	0,00	0,00	0,00	8,82	0,40	37,45	1,70	0,00	0,00
25	0,00	0,00	0,00	0,00	3,16	0,14	18,00	0,82	0,00	0,00
26	0,00	0,00	0,00	0,00	1,02	0,05	7,14	0,32	0,00	0,00
	7,40	0,34	65,19	2,96	183,71	8,36	210,36	9,56	66,98	3,05

Tab. 25: Insulinwerte (µE/ml u. ng/ml) im oralen Glucosebelastungstest (100 g Glucose oral) bei einem Patienten mit bioptisch gesicherter Leberzellverfettung und einem latenten Diabetes mellitus nach säulenchromatographischer Abtrennung des Proinsulins (Sephadex G 50 superfine).

Frakt.	0'		30'		60'		120'		180'	
Nr.	pM/ml	ng/ml	pM/ml	ng/ml	pM/ml	ng/ml	pM/ml	ng/ml	pM/ml	ng/ml
13	0,02	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
14	0,02	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
15	0,02	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
16	0,02	0,06	0,02	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	0,12
17	0,05	0,15	0,02	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,54	1,63
18	0,55	1,66	0,07	0,21	0,00	0,00	0,00	0,00	2,00	6,04
19	0,38	1,15	2,00	6,04	0,07	0,21	0,02	0,06	1,10	3,30
20	0,11	0,32	2,00	6,04	2,00	6,04	0,02	0,06	0,64	1,93
21	0,04	0,12	2,00	6,04	2,00	6,04	0,38	1,15	0,29	0,88
22	0,02	0,06	0,40	1,21	2,00	6,04	1,40	4,23	0,12	0,36
23	0,02	0,06	0,09	0,27	1,40	4,23	1,40	4,23	0,07	0,21
24	0,00	0,00	0,04	0,12	0,20	0,60	0,84	0,54	0,03	0,09
25	0,00	0,00	0,02	0,06	0,10	0,30	0,48	1,45	0,00	0,00
26	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,06	0,16	0,48	0,00	0,00
27	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,09	0,27	0,00	0,00
28	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,06	0,00	0,00
	1,25	3,76	6,66	20,11	7,79	23,52	4,81	14,52	4,83	14,56

Tab. 26: C-Peptidwerte (pMol/ml u. ng/ml) im oralen Glucosebelastungstest (100 g Glucose oral) bei einem Patienten mit bioptisch gesicherter Leberzellverfettung und einem latenten Diabetes mellitus nach säulenchromatographischer Abtrennung des Proinsulins (Sephadex G 50 superfine).

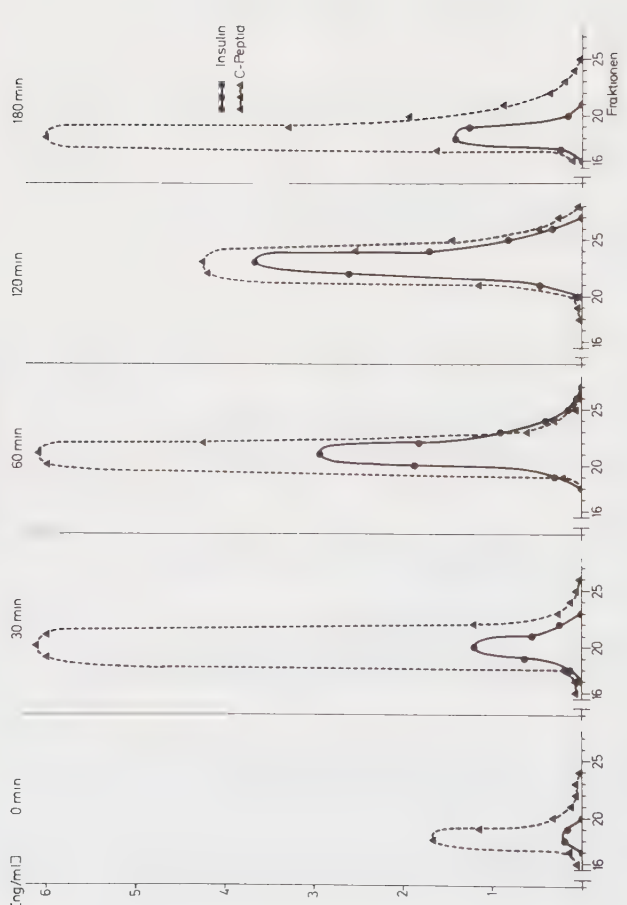

Abb. 44: Insulin- (IRI) und C-Peptidelutionsdiagramme (IRCP) nach säulenchromatographischer Abtrennung des Proinsulins (Sephadex G 50 superfine) im oralen Glucosebelastungstest bei einem Patienten mit bioptisch gesicherter Leberzellverfettung und einem latenten Diabetes mellitus

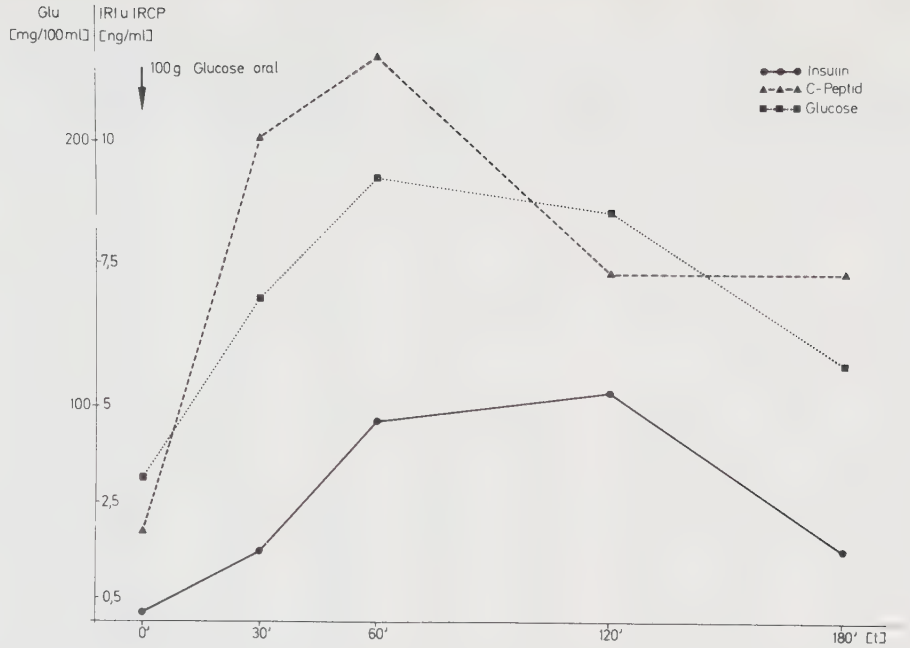

Abb. 45: Glucose (Glu), Insulin (IRI) und C-Peptid (IRCP) nach Applikation von 100 g Glucose oral bei einem Patienten mit bioptisch gesicherter Leberzellverfettung und einem latenten Diabetes mellitus

Frakt.	0'		30'		60'		120'		180'	
Nr.	µE/ml	ng/ml	µE/ml	ng/ml	µE/ml	ng/ml	µE/ml	ng/ml	µE/ml	ng/ml
16	0,00	0,00	0,00	0,00	2,29	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00
17	0,00	0,00	0,00	0,00	4,24	0,19	0,00	0,00	0,00	0,00
18	1,64	0,08	2,26	0,10	7,24	0,33	0,00	0,00	1,31	0,06
19	14,96	0,68	21,26	0,97	10,46	0,48	0,00	0,00	27,70	1,26
20	11,32	0,51	54,19	2,46	23,80	1,08	0,00	0,00	26,49	1,20
21	6,98	0,32	35,34	1,61	50,16	2,28	8,96	0,41	10,22	0,46
22	3,29	0,15	16,21	0,74	41,66	1,89	26,18	1,19	1,68	0,08
23	0,00	0,00	7,14	0,32	6,82	0,31	20,04	0,91	0,00	0,00
24	0,00	0,00	2,05	0,09	3,29	0,15	10,11	0,46	0,00	0,00
25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,03	0,18	0,00	0,00
	38,19	1,73	138,45	6,29	149,96	6,81	69,32	3,15	67,40	3,06

Tab. 27: Insulinwerte (µE/ml u. ng/ml) im oralen Glucosebelastungstest (100 g Glucose oral) bei einem Patienten mit manifestem Diabetes mellitus nach säulenchromatographischer Abtrennung des Proinsulins (Sephadex G 50 superfine).

Frakt.	0'		30'		60'		120'		180'	
Nr.	pM/ml	ng/ml	pM/ml	ng/ml	pM/ml	ng/ml	pM/ml	ng/ml	pM/ml	ng/ml
15	0,02	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
16	0,02	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
17	0,04	0,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,09
18	0,14	0,42	0,05	0,15	0,00	0,00	0,03	0,09	0,28	0,85
19	2,00	6,04	1,40	4,23	0,04	0,11	0,03	0,09	1,40	4,23
20	2,00	6,04	2,00	6,04	1,40	4,23	0,04	0,12	1,40	4,23
21	1,40	4,23	2,00	6,04	2,00	6,04	0,48	1,45	0,80	2,40
22	0,21	0,63	1,40	4,23	2,00	6,04	1,04	3,14	0,32	0,97
23	0,05	0,15	0,33	0,99	0,29	0,88	1,40	4,23	0,20	0,60
24	0,02	0,06	0,11	0,32	0,10	0,30	0,63	1,90	0,09	0,27
25	0,00	0,00	0,05	0,15	0,02	0,06	0,39	1,18	0,00	0,00
26	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,30	0,00	0,00
27	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	0,12	0,00	0,00
	5,90	17,81	7,34	22,15	5,85	17,66	4,18	12,62	4,52	13,64

Tab. 28: C-Peptidwerte (pMol/ml u. ng/ml) im oralen Glucosebelastungstest (100 g Glucose oral) bei einem Patienten mit manifestem Diabetes mellitus nach säulenchromatographischer Abtrennung des Proinsulins (Sephadex G 50 superfine).

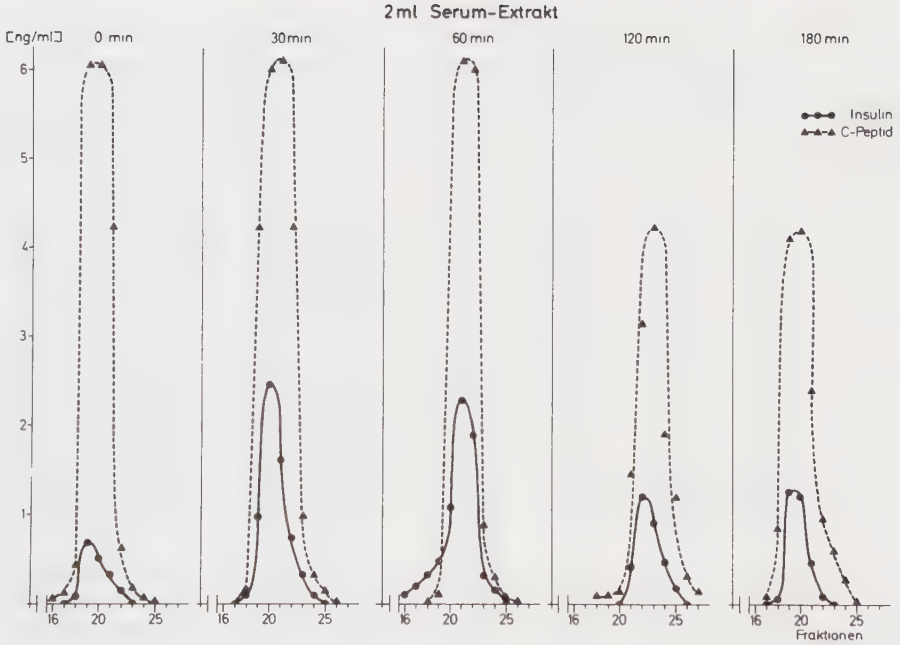

Abb. 46: Insulin- (IRI) und C-Peptidelutionsdiagramme (IRCP) nach säulenchromatographischer Abtrennung des Proinsulins (Sephadex G 50 superfine) im oralen Glucosebelastungstest bei einem Patienten mit manifestem Diabetes mellitus

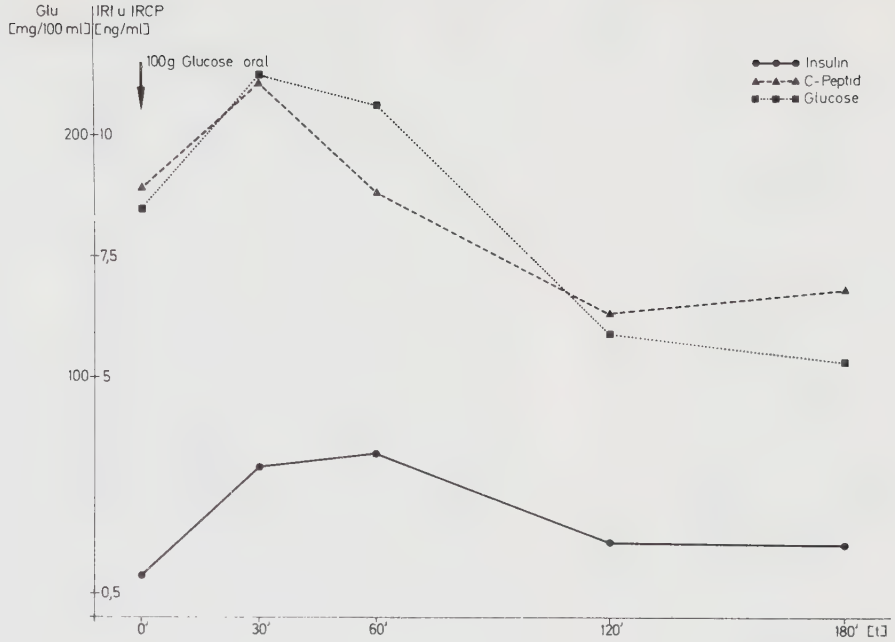

Abb. 47: Glucose (Glu), Insulin (IRI) und C-Peptid (IRCP) nach Applikation von 100 g Glucose oral bei einem Patienten mit manifestem Diabetes mellitus

4 Diskussion

4.1 Metabolismus und Degradation von Insulin, Proinsulin und C-Peptid

Im Gegensatz zu anderen Autoren (STOLL et al. 1970, SCHLICHTKRULL 1971) postulierten RUBENSTEIN und Mitarbeiter (1969) aufgrund theoretischer Überlegungen und in vitro Experimenten äquimolare Konzentrationen an Insulin und C-Peptid im Serum. Doch schon kurze Zeit später stellte man fest, daß die molare Konzentration an C-Peptid im peripheren Blut wesentlich höher ist als die an Insulin (BLOCK et al. 1972). Man interpretierte Kreuzreaktionen mit Degradationsprodukten des Proinsulins und dessen Intermediären.

Als entscheidender Faktor für die Plasmakonzentration an Insulin, Proinsulin und C-Peptid waren bis dahin unterschiedliche Sekretionsraten aus den ß-Zellen des Pankreas angenommen worden. In vivo und in vitro Untersuchungen zeigten jedoch, daß ein Unterschied in der peripheren Verteilung, im Metabolismus und der Degradation von Insulin, Proinsulin und C-Peptid besteht (STARR und RUBENSTEIN 1974).Man hatte festgestellt, daß die Halbwertszeit von Proinsulin bei Hunden (RUBENSTEIN et al. 1970), Schweinen, Ratten und Pavianen (STOLL et al. 1971) zwei- bis dreimal so lang ist wie für Insulin. KATZ und RUBENSTEIN untersuchten 1973 den Stoffwechsel von Proinsulin, Insulin und C-Peptid in der Ratte. Für Insulin wurde eine totale metabolic clearance rate (MCR) gefunden (16,4 ± 0,4 ml/min), die weit über der von Proinsulin (6,7 ± 0,3 ml/min) und C-Peptid (4,6 ± 0,2 ml/min) liegt.

Der renale Anteil am peripheren Metabolismus ist beim Insulin mit 33% wesentlich niedriger als beim Proinsulin und C-Peptid, wo die renale Beseitigung aus der Zirkulation 55 und 69% ihrer MCR ausmacht. Die Niere scheint daher das wichtigste Organ für die Degradation von Proinsulin und

C-Peptid zu sein, während die Metabolisierung des Insulins in erster Linie über die Leber abläuft.

Daß die Leber eine wesentliche Rolle im Stoffwechselgeschehen des Insulins spielt, zeigen Versuche in denen die Insulinkonzentration im portalen und peripheren Blut bestimmt wurde (ERWALD et al. 1971, BERGER et al. 1973). Da das Insulin zunächst in das portale System sezerniert wird und über die Leber in die Peripherie gelangt, wurde für die Tatsache, daß die Nüchternkonzentration an portalem Insulin zweimal und unter Belastung zehnmal so groß ist wie die in der Peripherie die Möglichkeit der Aufnahme oder Degradation des Insulins durch die Leber diskutiert.

Ähnliche Untersuchungen wurden später von HORWITZ et al. (1975) sowohl über das Insulin als auch über das Proinsulin und C-Peptid gemacht.

Die Konzentrationen der drei Komponenten wurden sowohl im portalen als auch im peripheren venösen Blut gemessen. Das Ergebnis der Untersuchungen zeigte, daß Insulin und C-Peptid beim Menschen in äquimolaren Mengen sezerniert werden und daß Proinsulin im selben Verhältnis zu Insulin wie im Pankreas ausgeschüttet wird. Im Serum war die molare C-Peptidkonzentration wesentlich höher als die des Insulins. Von den Autoren wurde sowohl die unterschiedliche Halbwertszeit von Insulin (+ 1/2 4,8 min) und C-Peptid (+ 1/2 11,1 min) als Grund dafür diskutiert als auch auf die größere hepatische Extraktion des Insulins hingewiesen. Zu ähnlichen Ergebnissen kommen auch HEDING und Mitarbeiter.

4.2 Qualitative Betrachtung der Insulin- und C-Peptidkurven in den einzelnen Glukose-Toleranz-Tests

Betrachten wir nun die Kurvenläufe der von uns aus dem Serum bestimmten Insulin- und C-Peptidkonzentrationen, so stellen

wir rein qualitativ eine recht gute Übereinstimmung der beiden Kurven fest. Bis auf zwei Ausnahmen (Abb. 25 u. 43) ist jedoch der Kurvenverlauf des C-Peptids parallel in höhere Konzentrationsbereiche verschoben. Damit bestätigt sich auch für unsere Untersuchung, daß in der Peripherie das Insulin und C-Peptid nicht in äquimolaren Mengen vorkommt, sondern daß dort die C-Peptidkonzentration die des Insulins bei weitem übertrifft.

Ausgehend von einem deutlich erhöhten Ausgangswert, steigt die C-Peptidkonzentration (IRCP) in den meisten Fällen steiler an als die Insulinkonzentration (IRI), was wahrscheinlich auf die unterschiedlich starke Aufnahme von IRI und IRCP in Leber und Peripherie in der frühen Phase der Insulinsekretion zurückzuführen ist.

Auffällig ist, daß der C-Peptidspiegel wesentlich langsamer auf seinen Ausgangswert zurücksinkt als das IRI; besonders deutlich wird das in den Kurvenverläufen des iv. GTT von Patient 4 und Patient 1 (Abb. 35 u. 33).

GRÜNEKLEE und Mitarbeiter (1976) interpretieren dies als deutlich geringere Degradation des IRCP.

Im Gegensatz zu den obengenannten Autoren, bei denen unter Tolbutamid das IRCP um wenige Minuten verzögert war, korrelieren unsere IRCP- und IRI-Kurven im Tolbutamid-Test sehr gut (Abb. 25, 27, 29 u. 31).

Hervorragende Übereinstimmung der Maxima vor allem auch mit dem Maximum des Blutzuckers finden wir beim iv. Glukose-Toleranz-Test (Abb. 33, 35 u. 37).

Etwas weniger eindeutig, jedoch insgesamt recht gut korrelierend, sind die Kurvenverläufe im oralen Glukose-Toleranz-Test (Abb. 39, 41, 43, 45 u. 47).

KOBAYASHI (1975) findet beim Schwein unter Glukosebelastung das Maximum für IRI früher als das Maximum für IRCP. In unseren oralen Glukose-Toleranz-Tests sind die beiden Maxima

in allen Fällen unterschiedlich verschoben, was sicher auch daran liegt, daß die Tests z.T. pathologisch sind. Der Patient 5 z.B. zeigt in allen drei Tests extrem hohe Basalwerte, demzufolge sind auch die C-Peptidwerte signifikant erhöht (Abb. 31, 37 u. 47).

4.3 Der molare C-Peptid/Insulin-Quotient

Um eine Vorstellung von der unterschiedlichen Größenordnung der C-Peptid- und Insulinkonzentrationen zu bekommen, wurde ein molarer C-Peptid/Insulin-Quotient gebildet (Abb. 48).

Wir sehen, daß die Nüchternwerte des C-Peptids 5 - 10 mal so groß sind wie die des Insulins. Steigt die Insulinkonzentration unter Belastung auf ihr Maximum an, so verringert sich der molare Quotient und erreicht in einigen Fällen den Wert 1, d.h., daß hier äquimolare Mengen an Insulin und C-Peptid vorliegen.

4.4 Quantitative Aussagen über die Insulin- und C-Peptidkonzentrationen in den einzelnen Glukose-Toleranz-Tests

Nur wenige Autoren haben bislang quantitative Aussagen über die Insulin- und C-Peptidkonzentrationen in den einzelnen Tests gemacht (Tab. 29).

Betrachten wir zunächst die Basalwerte und Maxima im iv. GTT. Wir erhalten dort einen durchschnittlichen Insulinbasalwert, der bei 0,45 ng/ml liegt, das Insulinmaximum finden wir bei durchschnittlich 2,5 ng/ml. Für das C-Peptid errechnen sich folgende Werte:

Basalwert:	2,8 ng/ml
Maximum:	6,5 ng/ml

Diese Werte stimmen sehr gut mit den von HORWITZ und Mitarbeitern (1975) publizierten Insulin- und C-Peptidkonzentrationen überein.

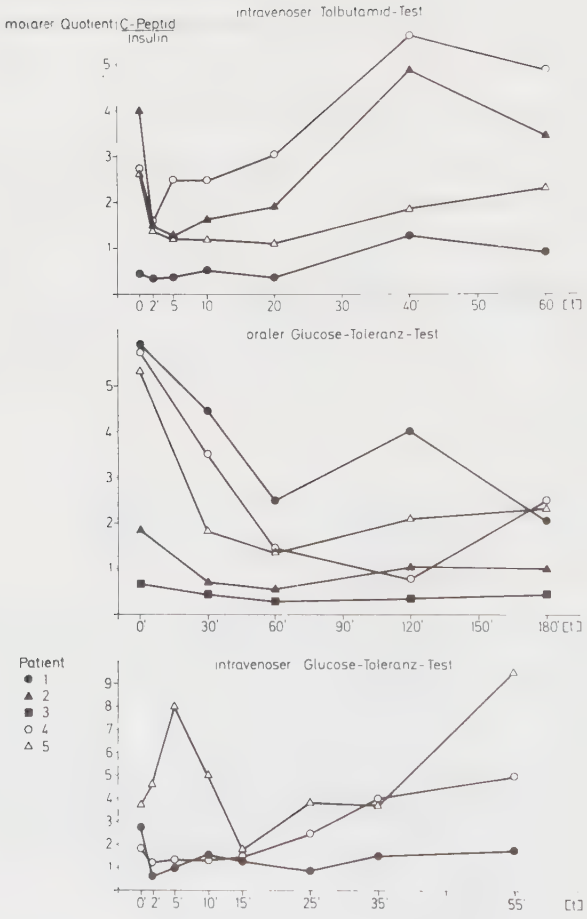

Abb. 48: Molarer Quotient C-Peptid/Insulin bei fünf Patienten in den drei Glucose-Toleranz-Tests

Intravenöser Glucose-Toleranz-Test

(t)	Insulin (ng/ml)	C-Peptid (ng/ml)
0'	0,13	0,66
Max	1,96	2,42
0'	0,27	0,98
Max	1,84	4,22
0'	0,50	3,60
Max	1,24	6,36
0'	0,45	2,80
Max	2,50	6,50

Intravenöser Tolbutamid-Test

0'	0,50	0,46
Max	4,80	3,25
0'	0,28	1,50
Max	1,70	5,20
0'	0,99	5,00
Max	2,34	6,27
0'	0,23	1,73
Max	1,75	5,60
0'	0,50	2,17
Max	2,65	5,00

Oraler Glucose-Toleranz-Test

(t)	Insulin (ng/ml)	C-Peptid (ng/ml)
0'	0,75	0,95
Max	5,46	3,15
0'	0,25	2,90
Max	1,63	9,60
0'	0,17	1,88
Max	4,78	11,70
0'	0,86	8,90
Max	3,40	11,07
0'	0,15	0,56
Max	3,50	4,88
0'	0,45	1,1
Max	3,74	7,0

Tab. 29: Die absoluten und durchschnittlichen Basal- und Maximalwerte der fünf Patienten in den drei Glucose-Toleranz-Tests

Insulin	0' = 0,36 ng ± 0,21 / ml
	5' = 2,73 ng ± 0,33 / ml
C-Peptid	0' = 3,54 ng ± 2,05 / ml
	5' = 7,61 ng ± 0,04 / ml

W. BLACKARD gibt die maximale Insulinkonzentration im iv. GTT mit 4 ng/ml an (BLACKARD et al. 1970).

Eine ähnlich gute Übereinstimmung finden wir zwischen unseren Insulin- und C-Peptidmaxima im Tolbutamid-Test (Insulin: 2,65 ng/ml; C-Peptid: 5,0 ng/ml) (Tab. 29) und den von J. SERVICE (1975) für diesen Test angegebenen Werten (Insulin: 2,5 ng/ml; C-Peptid: 4 ng/ml).

Für den OGTT errechnen sich folgende Durchschnittswerte:

Insulin	0'	:	0,45 ng/ml
	Max.	:	3,74 ng/ml
C-Peptid	0'	:	1,1 ng/ml
	Max.	:	7,0 ng/ml

Auch hier finden wir eine ausgezeichnete Übereinstimmung mit den von L. G. HEDING (1974) veröffentlichten Werten:

Insulin	0'	:	0,5 ng/ml
	Max.	:	3,2 ng/ml
C-Peptid	0'	:	1,0 ng/ml
	Max.	:	6,9 ng/ml

Sowohl RUBENSTEIN (1972) als auch BLOCK (1972) liegen mit ihren Angaben über die maximalen C-Peptidwerte im OGTT wesentlich niederiger.

Aufgrund der sehr aufwendigen Versuchsanordnung konnten leider nur wenige Patienten untersucht werden. Das vorliegende Versuchsmaterial zeigt jedoch schon sehr deutlich eine auch quantitative Korrelation zwischen dem Insulin und C-Peptid.

Um eine statistische Aussage zu den Ergebnissen machen zu können, müßten weitere Versuche dieser Art durchgeführt werden. Damit wäre auch die Möglichkeit gegeben, die Kurven hinsichtlich der verschiedenen diabetischen Stoffwechsellagen der einzelnen Patienten zu interpretieren.

Einen interessanten Ansatzpunkt bietet z.B. der Tolbutamid-Test des Patienten 1 und der orale Glukose-Toleranz-Test von Patient 3 (Abb. 25 u. 43). In beiden Fällen liegen die Insulinwerte deutlich höher als die C-Peptidwerte. Um eine Entscheidung zu treffen, ob es sich hierbei womöglich um Artefakte oder um eindeutig pathologische Ergebnisse handelt, müßten weitere Patienten mit ähnlichen klinischen Befunden untersucht werden. Voraussetzung für größer angelegte Versuchsreihen wäre jedoch die Vereinfachung der Versuchsanordnung bzw. eine Verbesserung des C-Peptid-Kits dahingehend, daß eine quantitative Bestimmung des C-Peptids direkt aus dem Serum ohne Vorbehandlung möglich wäre.

Damit würde man auch routinemäßig einen weiteren aussagekräftigen Parameter für die Diagnose des Diabetes mellitus gewinnen.

5 Zusammenfassung

1970 wurde von MELANI et al. ein Radioimmunoassay für das menschliche C-Peptid entwickelt.
Da man für das Insulin und C-Peptid eine Sekretion aus den ß-Zellen des Pankreas in äquimolaren Mengen postuliert hatte, war damit die Möglichkeit geschaffen, die ß-Zell-Funktion bei insulinabhängigen Diabetikern zu kontrollieren. Man stellte jedoch später fest, daß die molare Konzentration an C-Peptid im peripheren Blut wesentlich höher ist als die an Insulin.

Um die Frage nach der Korrelation zwischen Insulin und C-Peptid zu klären, war die säulenchromatographische Abtrennung des Proinsulins von den beiden Komponenten Insulin und C-Peptid die wichtigste Voraussetzung, da das Proinsulin im Radioimmunoassay als Störfaktor auftritt (Kreuzreaktion).

Es wurden die drei Säulenfüllmaterialien Sephadex G 15, G 50 fine und G 50 superfine auf ihre Wiederfindungsraten und ihre Trennqualität überprüft.

Die mit Sephadex G 50 sf gefüllten Säulen wurden mit radioaktiv markiertem Insulin, Proinsulin und C-Peptid geeicht; und es wurde eine sinnvolle Verdünnung der Fraktionen vor der Insulin- und C-Peptidbestimmung gefunden.

Da nur geringe Mengen an Patientenserum zur Verfügung standen, wurde die bis dahin für Extraktion und Säulenlauf in der Literatur angegebene Menge von 7 - 10 ml Serum auf 2 ml reduziert.

Bei fünf Patienten unterschiedlicher Glukosestoffwechsellage wurden folgende KH-Stoffwechsel-Toleranz-Tests durchgeführt:

1. Oraler Glukose-Toleranz-Test mit 100 g Traubenzucker.

2. Intravenöser Glukose-Toleranz-Test nach CONARD.

3. Intravenöser Tolbutamid-Test in der Auswertung nach LANGE und KNICK.

Mit dem Blutzucker wurde gleichzeitig das immunologisch meßbare Serum-Insulin und C-Peptid bestimmt.

Nach säulenchromatographischer Abtrennung des Proinsulins, mittels der von uns erstellten Versuchsanordnung, wurden die Meßwerte der Insulin- und C-Peptidbestimmung und die sich daraus ergebenden Elutionsdiagramme erhalten.

Die aus der Summe der Einzelwerte errechneten Insulin- und C-Peptidserumspiegel wurden als Funktion der Zeit aufgetragen.

Die Kurven bieten die Diskussionsgrundlage zur qualitativen und quantitativen Aussage über das Insulin und C-Peptid im peripheren Blut. Rein qualitativ stellen wir eine sehr gute Übereinstimmung der Kurvenverläufe der von uns aus dem Serum bestimmten Insulin- und C-Peptidkonzentrationen fest; jedoch ist der Kurvenverlauf des C-Peptids parallel in höhere Konzentrationsbereiche verschoben. Damit bestätigt sich auch für unsere Untersuchung, daß in der Peripherie das Insulin und C-Peptid nicht in äquimolaren Mengen vorkommt, sondern daß dort die C-Peptidkonzentration die des Insulins bei weitem übertrifft.

Wir sehen, daß die Nüchternwerte des C-Peptids 5 - 10 mal so groß sind wie die des Insulins. Steigt die Insulinkonzentration unter Belastung auf ihr Maximum an, so verringert sich der molare Quotient und erreicht in einigen Fällen den Wert 1, d.h., daß hier äquimolare Mengen an Insulin und C-Peptid vorliegen.

Die durchschnittlichen Basalwerte und Maxima von Insulin und C-Peptid in den einzelnen Tests werden mit Angaben in der Literatur verglichen.

Voraussetzung für einen auch routinemäßigen Einsatz der C-Peptidbestimmung, wäre eine Verbesserung des C-Peptid-Kits dahingehend, daß eine quantitative Bestimmung des C-Peptids direkt aus dem Serum ohne Vorbehandlung möglich wäre.

6 Literatur

BEISCHER, W. — Insulin, Proinsulin und C-Peptid im Serum bei Hypoglycaemia factitia
Verh. Dtsch. Ges. In.Med. 81 (1971)
p. 1493 - 1495

BEISCHER, W., E. HEINZE, L. KELLER, S. RAPTIS, W. KERNER, E.F. PFEIFFER — Human C-Peptide
Part. II: Clinical Studies
Klin. Wschr. 54 (1976)
p. 717 - 725

BERGER, W., H. GÖSCHKE, J. MOPPERT, H. KÜNZLI — Insulin Concentrations in Portal Venous and Peripheral Venous Blood in Man Following Administration of Glucose, Galactose, Xylitol and Tolbutamide
Horm. Metab. Res. 5 (1973)
p. 4 - 8

BERSON, S.A., R. S. YALOW — Recent Studies on Insulin Binding Antibodies
Ann. N. Y. Acad. Sci. 82 (1959)
p. 338 - 344

BLACKARD, W.G., N.C. NELSON — Portal and Peripheral Vein Immunoreactive Insulin Concentrations Before and After Glucose Infusion
Diabetes 19 (1970)
p. 302 - 306

BLOCK, M.B.,
M. MAKO,
D. F. STEINER,
A. H. RUBENSTEIN

Serum C-Peptide Immunoreactivity:
An Indicator of Beta Cell Activity in Diabetics
Diabetes 20 (Suppl. 1) (1971)
p. 332 - 333

BLOCK, M.B.,
M. MAKO,
D.F. STEINER,
A.H. RUBENSTEIN

Circulating C-Peptide Immunoreactivity
Studies in Normals and Diabetic Patients
Diabetes 21 (1972)
p. 1013 - 1026

BLOCK, M.B.,
M. MAKO,
D.F. STEINER,
A.H. RUBENSTEIN

Diabetic Ketoacidosis: Evidence for C-Peptide and Proinsulin Secretion Following Recovery
J. Clin. Endocrinol Metab. 35 (1972)
p. 402 - 406

BLOCK, M.B.,
R.L. ROSENFIELD,
M. MAKO,
D.F. STEINER,
A.H. RUBENSTEIN

Sequential Changes in Beta-Cell Function in Insulin-Treated Diabetic Patients Assessed by C-Peptide Immunoreactivity
N. Engl. J. Med. 288 (1973)
p. 1144 - 1148

CONARD, V.,
J.R. FRANCKSON,
P.A. BASTENIE,
J. KESTENS,
L. KOVACS

Mesure d l'assimilation du glucose; bases theoriques et applications cliniques
Acta grastro-ent. belg. 18 (1955)
p. 655, 727 und 803

DITSCHUNEIT, H.,
J.D. FAULHABER
Determination and Preparations of Insulin
A. Radioimmunoassay of Insulin
Handbuch: Insulin II (1975)
p. 665 - 670

ECKERT, H.G.
Die Technik des Radioimmunoassays
Angew. Chemie 17 (1976)
p. 565 - 573

ERWALD, R.,
R. HED,
A. NYGREN,
S. RÖJDMARK,
L. SUNDBLAD,
K.L. WIECHEL
Immunoreactive Insulin in the Portal and the Peripheral Venous Blood after Intravenous Tolbutamide Administration
Diabetes Vol. 20, No. 10 (1971)
p. 686 - 690

FINK, G.,
J.C. CRESTO,
R.A. GUTMAN,
R.L. LAVINE
A.H. RUBENSTEIN
Plasma Proinsulin-Like Material in Insulin Treated Diabetics
Horm. Metab. Res. 6 (1974)
p. 439 - 443

FISCHER, L.
An Introduction to Gel Chromatography
aus "Laboratory techniques in Biochemistry and Molecular Biology"
Amsterdam, London, 1969

FRERICHS, H.
Sekretion des Insulins, Hypothesen
Münch. med. Wschr. 117 (1975)
Nr. 41
p. 1639 - 1642

GRÜNEKLEE, D., H. DROST; F.A. GRIES
Das Verhalten des C-Peptids im Serum unter Belastung mit Glucose und Tolbutamid
Vortrag: 11. Jahrestagung d. dt. Diabetes Gesellschaft
27. - 29. 5. 1976

HAUSMANN, L., R. SCHUBOTZ, P. ZÖFEL, H. KAFFARNIK
A Statistical Comparison between Different Tests for the Diagnosis of Latent Diabetes and their Clinical Relevance
Acta Diabetologica Latina
Vol. 12, 2 (1975)
p. 160 - 168

HEDING, L.G.
Determination of Total Serum Insulin (IRI) in Insulin-treated Diabetic Patients
Diabetologia 8 (1972)
p. 260 - 266

HEDING, L.G., V.D. LARSEN, J. MARKUSSEN
Radioimmunoassays for Human, Pork and Ox C-peptides and Related Substances
Horm. Metab. Res., Suppl. 5 (1974)
p. 40 - 44

HEDING, L.G.
Radioimmunological Determination of Human C-Peptide in Serum
Diabetologia 11 (1975b)
p. 541 - 548

HEDING, L.G., S.M. RASMUSSEN
Human C-Peptide in Normal and Diabetic Subjects
Diabetologia 11 (1975a)
p. 201 - 206

HORWITZ, D.L.,
R. SANDLER,
A.H. RUBENSTEIN
Hypoglycemia and Endogenous Hyperinsulinism Complicating Diabetes Mellitus
The Am. J. of Med. Vol. 59 (1975a)
p. 730 - 735

HORWITZ, D.L.,
J. STARR,
M. MAKO,
W. BLACKARD,
A.H. RUBENSTEIN
Proinsulin, Insulin, and C-Peptide Concentrations in Human Portal and Peripheral Blood
The Journal of Clinical Investigation Vol. 55 (1975b)
p. 1278 - 1283

HORWITZ, D.L.,
A.H. RUBENSTEIN,
C. REYNOLDS,
G.D. MOLNAR,
N. YANAIHARA
Prolonged Suppression of Insulin Release by Insulin - Induced Hypoglycemia:
Demonstration by C-Peptide Assay
Horm. Metab. Res. 7 (1975c)
p. 449 - 452

HORWITZ, D.L.,
H. KUZUYA,
A.H. RUBENSTEIN
Circulating Serum C-Peptid.
Medical Intelligence Vol. 295
No. 4 (1976)
p. 207 - 209

HUMBEL, R.E.
Biosynthesis of the Two Chains of Insulin
Proc. Natl. Acad. Sei 53 (1965)
p. 853

JAMIESON, J.D.,
G.E. PALADE
Intracellular Transport of Secretory Proteins in the Pancreatic Exocrine Cell.
I, Role of the Peripheral Elements of the Golgi Complex
J. Cell Biol. 34 (1967a)
p. 577 - 596

JAMIESON, J.D., G.E. PALADE
II. Transport to Condensing Vacuoles and Zymogen Granules
J. Cell Biol. 34 (1967b)
p. 597 - 615

JAMIESON, J.D., G.E. PALADE
III. Dissociation of Intracellular Transport from Protein Synthesis
J. Cell Biol. 39 (1968a)
p. 580 - 588

JAMIESON, J.D., G.E. PALADE
IV. Metabolic Requirements
J. Cell Biol. 39 (1968b)
p. 589 - 603

JAMIESON, J.D., G.E. PALADE
Condensing Vacuole Conversion and Zymogen Granule Discharge in Pancreatic Exocrine Cells. Metabolic Studies
J. Cell Biol. 48 (1971)
p. 503 - 522

KARLSON, P., W. GEROK, W. GROSS
Hormone der Bauchspeicheldrüse
Pathobiochemie
Stuttgart 1978
p. 212 - 229

KATZ, A.I., A.H. RUBENSTEIN
Metabolism of Proinsulin, Insulin and C-Peptide in the Rat
The Journal of Clinical Investigation Vol. 52 (1973)
p. 1113 - 1121

KEMMLER, W., A.H. RUBENSTEIN, D.F. STEINER
On the Biosynthesis, Intracellular Transport and Mechanism of Conversion of Proinsulin to Insulin and C-Peptide
Diabetes 21 (Suppl. 2); (1972)
p. 572 - 581

KEMMLER, W., D.F. STEINER
Die Umwandlung von Proinsulin in Insulin und C-Peptid in isolierten Langerhansschen Inseln der Ratte
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 79 (1973)
p. 1179 - 1181

KEMMLER, W.
Insulin Synthesis in ß-Cells
Handbuch: Insulin II (1975a)
p. 17

KEMMLER, W.
Secretion of Proinsulin and C-Peptide and their Significance
Handbuch: Insulin II (1975b)
p. 31 - 49

KOBAYASHI, K.
Responses of Plasma Insulin, C-peptide and Proinsulin-Like Components to Glucose and Glucagon in the Pig
Endocrinol. Japon. 22 (6) (1975)
p. 489 - 496

KUZUYA, H., P. BLEX, D.L. HORWITZ, D.F. STEINER, A.H. RUBENSTEIN
Determination of Free and Total Insulin and C-Peptide in Insulin-treated Diabetics
Diabetes Vol. 26, No. 1 (1977)
p. 22 - 29

LANGE, H.-J., B. KNICK, G. STARK, F. KAHLERT
Validitätsprüfung eines neuen graphischen Auswertungsverfahrens (T_3) des intravenösen Tolbutamid-Tests an diabetes-suspekten Kollektiven
Verh. Dtsch. Ges. inn. Med. 71 (1965)
p. 375

LEWIS, S.B., J.D. WALLIN, H. KUZUYA
Circadian Variation of Serum Glucose, C-Peptide Immunoreactivity and Free Insulin in Normal and Insulin-Treated Diabetic Pregnant Subject
Diabetologia 12, (1976)
p. 343 - 350

MELANI, F., A.H. RUBENSTEIN, P.E. OYER, D.F. STEINER
Identification of Proinsulin and C-Peptide in Human Serum by a Specific Immunoassay
Proc. Nat. Acad. Sci. V.S. 67 (1970a)
p. 148 - 155

MELANI, F., A.H. RUBENSTEIN, D.F. STEINER
Human Serum Proinsulin
The J. of Clin. Invest. Vol 49 (1970b)
p. 497 - 507

NAKAGAWA, S.,
H. NAKAYAMA,
T. SASAKI,
et al.

A Simple Method for the Determination of Serum Free Insulin Levels in Insulin-treated Patients
Diabetes Vol. 22, No. 8 (1973)
p. 590 - 560

PANITZ, N.

Methodische Grundlagen und praktische Durchführung von Radioimmunoassays
Med. Welt 37 (1976)
p. 1710 - 1715

PETRIDES, P.,
L. WEISS,
G. LÖFFLER,
O. WIELAND

Biochemie der im Zusammenhang mit dem Diabetes wichtigsten Hormone
Diabetes mellitus
München - Berlin - Wien 1972
p. 9 - 18

RUBENSTEIN, A.H.,
J.L. CLARK,
F. MELANI,
D.F. STEINER

Secretion of Proinsulin, C-Peptide by Pancreatic ß-Cells and its Circulation in Blood
Nature Vol. 224 (1969)
p. 697 - 699

RUBENSTEIN, A.H.,
M. MARKO,
D.F. STEINER,
D. BROWN,
T.N. PULLMAN

The Venal Extraction and Excretion of Proinsulin
J. Lab. clin. Med. 76 (1970)
p. 868

RUBENSTEIN, A.H.,
M.B. BLOCK,
F. MELANI,
M.D. STARR,
D.F. STEINER

Proinsulin and C-Peptide in Blood
Diabetes 21 (Suppl. 2) (1972)
p. 661 - 672

SCHLICHTKRULL, J.
Proinsuline et substances apparentées
Path et Biol. 19 (1971)
p. 885 - 892

SERVICE, F.J., A.H. RUBENSTEIN, D.L. HORWITZ
C-Peptide Analysis in Diagnosis of Fatitial Hypoglycemia in an Insulin-Dependent Diabetic
Mayo Clin Proc, Vol. 50 (1975)
p. 697 - 701

SÖLING, H.D.
Zum Mechanismus der akuten Insulinwirkung
Münch. med. Wschr. 117 (1975)
Nr. 41
p. 1635 - 1638

STARR, J.I., A.H. RUBENSTEIN
Metabolism of Endogenous Proinsulin and Insulin in Man
J. Clin. Endocrinol. Metab.
Vol. 38; No. 2 (1974)
p. 305 - 308

STEINER, D.F., P.E. OYER
The Biosynthesis of Insulin and a Probable Precusor of Insulin by a Human Islet Cell Adenoma
Proc. Natl. Acad. Sci. 57 (1967)
p. 473

STOLL, R.W., J.L. TOUBER, J.W. ENSINCK, R.H. WILLIAMS
Substances Immunologically Related to Proinsulin or Connecting Peptide in Swine Plasma
Horm. Metab. Res. 2 (1970)
p. 153 - 156

STOLL, R.W.,
J.L. TOUBER,
C.C. WINTERSCHEID,
J.W. ENSINCK,
R.H. WILLIAMS

Hypoglycemic Activity and Immunological Half-life of Porcine Insulin and Proinsulin in Baboons and Swine
Endocrinology 88 (1971)
p. 714 - 717

Herrn Priv. Doz. Dr. med. L. Hausmann möchte ich für die Anregung zu dieser Dissertation danken.

Lebenslauf

3. 8. 1949	Roswitha Schmidt, geb. in Kassel
1956 - 1960	Besuch der Grundschule in Kassel/Waldau
1960 - 1966	Besuch der Realschule in Kassel - B.
1966 - 1968	Besuch des Goethe-Gymnasiums in Kassel
15. 6. 1968	Reifeprüfung
1968 - 1973	Studium der Chemie an der Philipps-Universität Marburg
28. 9. 1973	Diplomchemiker-Hauptprüfung
1974	Beginn des Humanbiologiestudiums an der Philipps-Universität Marburg
1. 7. 1977	Beginn meiner Tätigkeit als wissenschaftliche Angestellte im Anatomischen Institut der Philipps-Universität Marburg

Meine akademischen Lehrer waren die Professoren und Dozenten:

Amon, Aurich, Berndt, Bock, Dehnicke, Dimroth, Doss, Försterling, Gallwitz, Hausmann, Hoffmann, Kadenbach, Kaffarnik, Karlson, Kirmse, Kleine, Koolman, v. Kraft, Kuhn, Lorberth, Lorenz, Luck, Mahr, Maier, Matthiesen, Nöth, Reichardt, Reinen, Riecken, Schäfer, Schmid, Schmidt, Schneier, Stuke, Walcher, Wesemann, Wiegandt